

Die Rolle der Aktivierung des
Lymphotoxin beta Rezeptors (LT β R)
bei Angiogenese und Tumorwachstum



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-
der naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und Vorklinische
Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von
Barbara Daller
aus Bad Birnbach
Dezember 2008

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2005 bis Dezember 2008 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Hehlhans am Institut für Immunologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am:	18.12.2008
Tag des Kolloquiums:	11.03.2009
Die Arbeit wurde angeleitet von:	Prof. Dr. Thomas Hehlhans Prof. Dr. Ralph Witzgall
Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. Stephan Schneuwly (Vorsitz) Prof. Dr. Ralph Witzgall Prof. Dr. Thomas Hehlhans Prof. Dr. Richard Warth

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

.....

Barbara Daller

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 DIE TUMORNEKROSEFAKTOR (TNF)/TNF-REZEPTOR-SUPERFAMILIE.....	1
1.2 DAS LTBR/LIGAND-SYSTEM: EXPRESSION UND AKTIVIERUNG DES NFkB-SIGNALWEGS	4
1.3 DIE FUNKTIONEN DES LTBR/LIGAND-SYSTEMS.....	9
1.3.1 Etablierung und Aufrechterhaltung der Organisation sekundärer lymphatischer Organe	9
1.3.2 Abwehr von viralen, bakteriellen und parasitären Infektionen	11
1.3.3 Autoimmunerkrankungen.....	12
1.4 DIE ROLLE DES LTBR BEI TUMORWACHSTUM UND ANGIOGENESE	14
1.5 ZIEL DER ARBEIT	18
2 MATERIAL	19
2.1 GERÄTE	19
2.2 VERBRAUCHSMATERIAL.....	20
2.3 CHEMIKALIEN, MEDIEN UND REAGENZIEN.....	21
2.4 PUFFER UND LÖSUNGEN	22
2.5 KITS	25
2.6 ENZYME.....	25
2.7 OLIGONUKLEOTIDE	25
2.8 PLASMIDE	26
2.9 ANTIKÖRPER.....	27
2.10 BAKTERIENSTÄMME.....	27
2.11 ZELLINIEN	27
2.12 VERSUCHSTIERE.....	28
2.13 SOFTWARE UND INTERNET-RESSOURCEN.....	28
2.14 SONSTIGES	28
3 METHODEN	29
3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	29
3.1.1 Bakterienkultur.....	29
3.1.2 Einfrieren von Bakterienkulturen	29
3.1.3 Transformation.....	29
3.1.4 Arbeiten mit DNA	29
3.1.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli.....	29
3.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
3.1.4.3 Agarosegelelektrophorese.....	30
3.1.4.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
3.1.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten.....	31
3.1.4.6 Restriktionsverdau von DNA.....	31
3.1.4.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA	32
3.1.4.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
3.1.5 Arbeiten mit RNA.....	32
3.1.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen.....	32

3.1.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Tumorgewebe	32
3.1.5.3	Reverse Transkription (RT)	33
3.1.5.4	Quantitative PCR (qPCR)	33
3.1.6	<i>Arbeiten mit Proteinen</i>	35
3.1.6.1	Expression der extrazellulären Domäne (EZD) des huLTβR in E. coli.....	35
3.1.6.2	Proteinextraktion aus E. coli	35
3.1.6.3	Reinigung der EZD des huLTβR mittels Ni-NTA-Agarose	36
3.1.6.4	Isolierung von nukleären Proteinextrakten aus BFS-1-Zellen	36
3.1.6.5	Messung der Proteinkonzentration.....	36
3.1.6.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.1.6.7	Coomassie-Färbung	37
3.1.6.8	Western Blot	37
3.1.6.9	Dot Blot.....	38
3.1.7	<i>„Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)</i>	38
3.1.7.1	ELISA zur Bestimmung von Immunglobulintitern im Mausserum.....	39
3.1.7.2	ELISA zur Austestung der Hybridomüberstände	39
3.1.7.3	ELISA zur Quantifizierung von IL-8 und MIP-2	40
3.1.8	<i>Luciferase Assay</i>	40
3.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	40
3.2.1	<i>Zellkulturbedingungen</i>	40
3.2.2	<i>Auftauen und Einfrieren von Zellen</i>	40
3.2.3	<i>Bestimmung der Lebendzellzahl</i>	41
3.2.4	<i>Mycoplasmentest</i>	41
3.2.5	<i>Stimulierung von BFS-1-Fibrosarkomzellen</i>	41
3.2.6	<i>Stimulierung von A375-Zellen</i>	42
3.2.7	<i>Stimulierung humaner Tumorzelllinien</i>	42
3.2.8	<i>Stimulierung von humanem Tumorgewebe</i>	43
3.2.9	<i>MTT-Test</i>	43
3.2.10	<i>Erstellung einer Wachstumskurve von BFS-1-Fibrosarkomzellen</i>	44
3.2.11	<i>Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen mittels DOTAP</i>	44
3.2.12	<i>Vorbereitung von Zellen für den Luciferase Assay</i>	44
3.2.13	<i>Zytozentrifugationspräparate</i>	44
3.2.14	<i>Durchflusszytometrie</i>	45
3.3	HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER.....	45
3.3.1	<i>Immunisierung von Mäusen</i>	45
3.3.2	<i>Gewinnung von Serum aus Vollblut</i>	46
3.3.3	<i>Gewinnung von Peritoneal-Exsudat-Zellen (PEC)</i>	46
3.3.4	<i>Isolierung von Milzzellen</i>	46
3.3.5	<i>Zellfusion mit Polyethylenglykol</i>	47
3.3.6	<i>Subklonierung von Hybridomzellen</i>	47
3.3.7	<i>Reinigung monoklonaler Antikörper</i>	48
3.3.8	<i>Bestimmung des Isotyps von Antikörpern</i>	48
3.4	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	48
3.4.1	<i>Tierhaltung und Versuchstiere</i>	48
3.4.2	<i>Erzeugung von Fibrosarkomen aus BFS-1-Zellen</i>	49

3.4.3	Messung des BFS-1-Tumorwachstums	49
3.4.4	Entnahme von BFS-1-Fibrosarkomen	49
3.4.5	Bestimmung der MIP-2-Expression von Fibrosarkomen <i>ex vivo</i>	49
3.5	IMMUNHISTOLOGISCHE METHODEN	50
3.5.1	Diff-Quick-Färbung von PECs	50
3.5.2	Färbung humaner Gewebe	50
3.6	STATISTIK	51
4	ERGEBNISSE	52
4.1	DIE ROLLE DER LTβR-AKTIVIERUNG BEI ANGIOGENESE UND TUMORWACHSTUM IN DER MAUS	52
4.1.1	Das LTβR-abhängige BFS-1-Tumormodell	52
4.1.2	Herunterregulation der Expression des LTβR in BFS-1-Fibrosarkomzellen mittels short hairpin RNA (shRNA)	52
4.1.2.1	Das shRNA-Plasmid	53
4.1.2.2	FACS-Analyse des Knock-downs der LTβR-Expression in den shRNA-Transfektanten	54
4.1.2.3	MIP-2-Expression der shRNA-Transfektanten	55
4.1.2.4	NFκB-Aktivierung in shRNA-Transfektanten	56
4.1.3	NFκB-Aktivierung in BFS-1-Fibrosarkomzellen	57
4.1.3.1	Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges	58
4.1.3.2	Aktivierung des alternativen NFκB-Signalweges	59
4.1.4	Herstellung von BFS-1-Transfektanten mit Hemmung im klassischen (IκBα SR) oder im alternativen (NIK DN) NFκB-Signalweg	60
4.1.4.1	Herstellung der beiden Vektoren pcDNA3.1-IκBα SR und pcDNA3.1-NIK DN ..	60
4.1.4.1.1	Klonierung des pcDNA3.1-IκBα SR-Vektors	60
4.1.4.1.2	Klonierung des pcDNA3.1-NIK DN-Vektors	61
4.1.4.2	Vergleich der transfizierten Zellen (BFS-1-IκBα SR und BFS-1-NIK DN) mit den wt-Fibrosarkomzellen	62
4.1.4.2.1	Wachstumsgeschwindigkeit <i>in vitro</i>	62
4.1.4.2.2	FACS-Analyse der Expression des LTβR	63
4.1.4.3	MIP-2-Expression der IκBα SR- und NIK DN-Transfektanten	64
4.1.4.4	NFκB-Aktivierung in den IκBα SR- und NIK DN-Transfektanten	65
4.1.4.4.1	Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges	65
4.1.4.4.2	Aktivierung des alternativen NFκB-Signalweges	66
4.1.4.5	Das BFS-1-Tumormodell mit den Transfektanten (IκBα SR und NIK DN)	68
4.1.4.5.1	Wachstumsverlauf	68
4.1.4.5.2	Tumorgewicht	69
4.1.4.5.3	MIP-2-Expression der Tumore <i>ex vivo</i>	69
4.2	DIE ROLLE DER LTβR-AKTIVIERUNG BEI ANGIOGENESE UND TUMORWACHSTUM IM HUMANEN SYSTEM	71
4.2.1	Herstellung und Charakterisierung monoklonaler anti-huLTβR Antikörper	71
4.2.1.1	Klonierung des Expressionsplasmids pQE-32-huLTβR	71
4.2.1.2	Expression der EZD des huLTβR in E. coli	73
4.2.1.3	Aufreinigung der EZD des huLTβR unter nativen Bedingungen	74
4.2.1.4	Immunisierung von Balb/c-Mäusen	75

4.2.1.5	Herstellung antikörperproduzierender Hybridome	76
4.2.1.6	Reinigung der Antikörper über eine Protein-G-Sepharose-Säule	77
4.2.1.7	Test der Antikörper im Dot Blot	77
4.2.1.8	Test der Antikörper im Western Blot	79
4.2.1.9	Test der Antikörper im Durchflusszytometer	79
4.2.1.10	Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen für die funktionelle Analyse der anti-huLT β R Antikörper 4D6 und 8A8	80
4.2.1.11	Analyse der agonistischen Wirkung der Antikörper 4D6 und 8A8	82
4.2.1.11.1	Induktion der IL-8-Expression	82
4.2.1.11.2	Stimulation des NF κ B-Signalwegs	83
4.2.1.12	Analyse der antagonistischen Wirkung der Antikörper 4D6 und 8A8	84
4.2.1.12.1	Blockade der IL-8-Expression	84
4.2.1.12.2	Hemmung der NF κ B-Aktivierung	85
4.2.1.13	Zusammenfassung der Charakterisierung der anti-huLT β R Antikörper	86
4.2.2	<i>Expression des LTβR in humanen Geweben</i>	87
4.2.2.1	Milz	87
4.2.2.2	Kolon- und Ovarialkarzinom	88
4.2.3	<i>Stimulation von humanem Tumormaterial mit rhuLIGHT und agonistischem anti-huLTβR Antikörper</i>	89
4.2.3.1	Nachweis der Expression von LT β R und HVEM im Kolon- und Ovarialkarzinomgewebe	89
4.2.3.2	Stimulation von primären Kolonkarzinomgeweben	90
4.2.3.2.1	Nachweis von IL-8 auf mRNA-Ebene	90
4.2.3.2.2	Nachweis von IL-8 auf Proteinebene	91
4.2.3.3	Stimulation von primären Ovarialkarzinomgeweben	92
4.2.3.3.1	Nachweis von IL-8 auf mRNA-Ebene	92
4.2.3.3.2	Nachweis von IL-8 auf Proteinebene	93
4.2.4	<i>Analyse verschiedener humaner Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien</i>	94
4.2.4.1	Nachweis der Expression des LT β R und von HVEM	95
4.2.4.2	Stimulierung der humanen Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien	96
4.2.4.3	Transfektion humaner Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien mit pcDNA3.1-I κ B α SR und pcDNA3.1-NIK DN	98
4.2.4.3.1	LoVo-I κ B α SR und LoVo-NIK DN	99
4.2.4.3.2	SK-OV-3-I κ B α SR und SK-OV-3-NIK DN	99
4.2.4.3.3	OVCAR-3-I κ B α SR und OVCAR-3-NIK DN	100
4.2.4.3.4	Caov-3-I κ B α SR und Caov-3-NIK DN	101
4.2.4.4	MTT-Test der transfizierten Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien	101
5	DISKUSSION	103
5.1	REDUKTION DER LTBR-EXPRESSION AUF BFS-1-FIBROSARKOMZELLEN MITTELS SHRNA.	103
5.2	AKTIVIERUNG BEIDER NF κ B-SIGNALWEGE IN DEN BFS-1-FIBROSARKOMZELLEN UND DIE AUSWIRKUNGEN AUF DAS TUMORWACHSTUM <i>IN VIVO</i>	104
5.3	HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTI-HULTBR ANTIKÖRPER	109
5.4	STIMULIERUNG VON HUMANEM PRIMÄRTUMORGEWEBE	111
5.5	STIMULIERUNG HUMANER KOLON- UND OVARIALKARZINOMZELLINIEN	114

6	ZUSAMMENFASSUNG.....	118
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	120
8	ANHANG	134
	DANKSAGUNG	135

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
ARD	<i>ankyrin repeat domain</i>
BAFF	<i>B cell activating factor belonging to the TNF family</i>
BLC	<i>B-lymphocyte chemoattractant</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum Albumin
BTLA	<i>B- and T-cell attenuator</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIA	Collagen-induzierte Arthritis
CMV	Cytomegalievirus
CRD	cysteinreiche Domäne
DcR	Decoyrezeptor
DD	Todesdomäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSS	<i>dextrane sodium sulfate</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELC	<i>Epstein Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
EZD	Extrazellulärdomäne
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FDC	Follikuläre Dendritische Zellen
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HEV	<i>high endothelial venule</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV	Herpes simplexvirus
HT	Hypoxanthin-Thymidin
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
HVEM	<i>herpes virus entry mediator</i>
i.p.	intraperitoneal
IDDM	Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
I κ B α SR	I κ B α Superrepressor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LCMV	lymphozytäres Choriomeningitisvirus

LIGHT	<i>lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for binding herpesvirus entry mediator on T cells</i>
LT	Lymphotoxin
LTIC	<i>lymphoid tissue-inducing cells</i>
LT β R	Lymphotoxin- β -Rezeptor
MAdCAM-1	<i>mucosal addressin vascular cell adhesion molecule-1</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MEF	murine Embryonalfibroblasten
MIP-2	<i>macrophage inflammatory protein-2</i>
M-MLV RT	<i>moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i>
n.d.	nicht detektierbar
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
NF κ B	nukleärer Faktor kappa B
NIK DN	dominant-negative Form von NIK
NIK	NF κ B-induzierende Kinase
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
OD	Optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEC	Peritoneal-Exsudat-Zellen
PEG	Polyethylenglykol
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PLAD	<i>preligand assembly domain</i>
POX	Peroxidase
r	rekombinant
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SDF-1	<i>stromal derived factor-1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLC	<i>secondary lymphoid tissue chemokine</i>
TD	TRAF-Domäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
THD	TNF-Homologie-Domäne
TIM	<i>TNF-receptor associated factor-interacting motif</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TRAF	<i>TNF-receptor associated factor</i>
VCAM-1	<i>vascular adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Die Tumornekrosefaktor (TNF)/TNF-Rezeptor-Superfamilie

Lymphotoxin (LT) und Tumornekrosefaktor (TNF) wurden vor beinahe vier Jahrzehnten als von Lymphozyten und Makrophagen exprimierte Zytokine entdeckt. Dabei zeigte sich, dass sie die Lyse von Zellen, vor allem von Tumorzellen, auslösen können (Carswell et al., 1975; Granger et al., 1969). Als die *complementary* DNA (cDNA) von LT α und TNF kloniert wurde und beide Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit aufwiesen, deutete dies auf eine mögliche Gen-Superfamilie hin (Gray et al., 1984; Pennica et al., 1984), welche in den folgenden Jahren als TNF/TNF-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie bezeichnet wurde. Bis heute umfasst sie mehr als 40 Mitglieder (siehe Abb. 1). Diese werden größtenteils von Immunzellen exprimiert und sind unter anderem an der Abwehr von Pathogenen, bei Entzündungsreaktionen, der Apoptose von Zellen, bei der Autoimmunität sowie der Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe beteiligt.

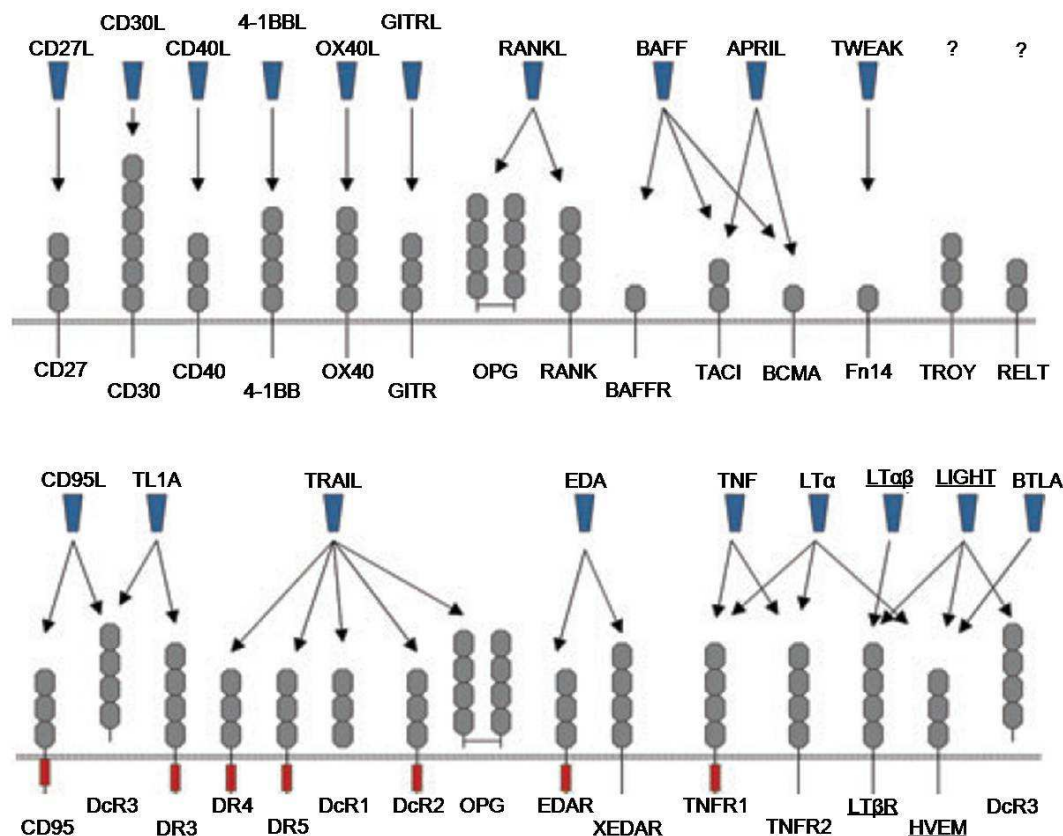


Abb. 1 Die TNF/TNFR-Superfamilie. Die Liganden sind in blau gezeichnet. Pfeile zeigen die möglichen Interaktionen der Liganden mit den Rezeptoren an. Die äußere Domäne der TNFR-Superfamilie ist mit der Anzahl an cysteinreichen Domänen (CRDs) in grau dargestellt. Todesdomänen im zytoplasmatischen Teil sind rot gezeichnet (Hehlsgans et al., 2005).

Die Liganden der TNF-Superfamilie sind Typ-II-Transmembranproteine (der N-Terminus liegt intrazellulär), die alle eine konservierte C-terminale Domäne tragen, welche als TNF-Homologie-Domäne (THD) bezeichnet wird. Mit ihr wird die Rezeptorbindung vermittelt. Die Sequenzidentität der THD zwischen den einzelnen Mitgliedern der TNF-Superfamilie liegt bei 20-30% (Bodmer et al., 2002). Die Liganden sind nur als Trimere, welche durch Selbstassoziation über nicht-kovalente Bindungen entstehen, biologisch aktiv (Idriss et al., 2000). Einige der Liganden kommen sowohl membrangebunden als auch löslich vor, wohingegen einige nur in der einen oder in der anderen Form biologisch aktiv sein können.

Die Rezeptoren der Superfamilie sind Typ-I-Transmembranproteine (der C-Terminus liegt intrazellulär), die als besonderes Kennzeichen eine unterschiedliche Anzahl an cysteinreichen Domänen (CRD) zur Ausbildung intrazellulärer Disulfidbrücken tragen (Smith et al., 1994). Die Rezeptoren bilden wie die Liganden Trimere, wobei sich einige Vertreter der TNFR-Superfamilie, wie z.B. TNFR1, TNFR2 oder CD40, bereits vor der Bindung des Liganden zusammenlagern können. Dies bedarf einer N-terminalen Domäne, die Teile der ersten CRD beinhaltet und als *preligand assembly domain* (PLAD) bezeichnet wird (Chan et al., 2000).

Die Aktivierung der Rezeptoren der TNFR-Superfamilie führt zu einer Anlagerung verschiedenster Adaptermoleküle, die wiederum zahlreiche Signalwege aktivieren können. Aufgrund der unterschiedlichen Möglichkeiten der Signalweiterleitung kann man die Mitglieder der TNFR-Superfamilie in drei Hauptgruppen unterteilen (siehe Abb. 2).

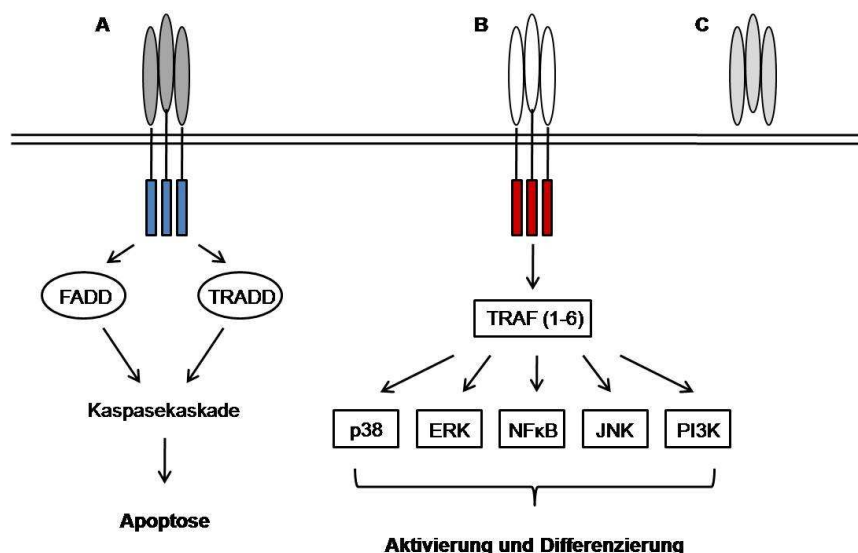


Abb. 2 Die drei Hauptgruppen der TNFR-Superfamilie. **A.** Rezeptoren der Superfamilie, die Todesdomänen (blau) im zytosomatischen Teil tragen und die Apoptose der Zellen auslösen. **B.** Rezeptoren der Superfamilie, die im zytosomatischen Teil TIM-Domänen (rot) tragen und verschiedene Signalwege aktivieren können. **C.** Rezeptoren der Superfamilie ohne eine zytosomatische Domäne. Hier findet keine Signalweiterleitung statt (modifiziert nach Dempsey et al., 2003).

In der ersten Gruppe, in die z.B. TNFR1 oder CD95 (FAS) eingeordnet werden, finden sich Rezeptoren, die in ihrer zytoplasmatischen Domäne sogenannte Todesdomänen (*death domain*= DD) tragen. Die Aktivierung dieser Art von Rezeptoren durch ihre korrespondierenden Liganden kann zu einer Anlagerung von Adaptermolekülen wie *Fas associated death domain* (FADD) oder *TNFR associated death domain* (TRADD) führen, wodurch es zu einer Aktivierung der Kaspase-Kaskade und letztendlich zur Induktion der Apoptose kommt (Nagata, 1997). Zusätzlich kann TNFR1 auch mit *TNFR-associated factor* (TRAF) 1 und 2 und mit dem *receptor interacting protein* (RIP) interagieren. Dadurch wird entweder der NFκB (nukleärer Faktor kappa B)- oder der JNK (c-Jun N-terminale Kinase)-Signalweg aktiviert, was dazu führt, dass die Zellen vor Apoptose geschützt sind (Hsu et al., 1996; Stanger et al., 1995).

Zur zweiten Gruppe der Rezeptoren gehören unter anderem TNFR2, Lymphotoxin-β-Rezeptor (LTβR) und *herpes virus entry mediator* (HVEM). Diese tragen keine Todesdomänen sondern eine oder mehrere *TRAF-interacting motifs* (TIMs) in ihrer zytoplasmatischen Domäne. Die Stimulation dieser Rezeptoren führt zu einer Anlagerung von TRAFs an die TIM-Domänen, wodurch wiederum verschiedene Signalwege wie NFκB, JNK, p38, ERK (*extracellular signal-related kinase*) oder PI3K (Phosphoinositid 3-Kinase) aktiviert werden können (Dempsey et al., 2003). Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind in Säugetieren sechs verschiedene TRAFs (TRAF1- TRAF6) bekannt. Diese während der Evolution konservierten Proteine sind schon bei *Drosophila melanogaster* oder bei *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen worden (Grech et al., 2000). Alle TRAFs tragen ein stark konserviertes Motiv am C-Terminus, das ungefähr 200 Aminosäuren lang ist und als TRAF-Domäne (TD) bezeichnet wird (Cao et al., 1996; Rothe et al., 1994). Diese ist für Bindung an die entsprechenden Rezeptoren und für die Bildung von Homo- oder Heterodimeren verantwortlich. Durch sie wird außerdem die Interaktion mit einer Vielzahl von intrazellulären Proteinen und Signalmolekülen vermittelt. Die TD kann man in zwei Bereiche einteilen: die TRAF-N-Region, deren Größe stark variiert und nicht konserviert ist und die TRAF-C-Domäne, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zwischen den Mitgliedern der TRAF-Familie aufweist (Wajant et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die TRAF-C-Domäne an Signalmoleküle wie TANK (Cheng et al., 1996) oder NIK (*NFκB-inducing kinase*) (Malinin et al., 1997; Song et al., 1997) bindet. Der N-terminale Bereich der TD interagiert hingegen mit anti-apoptotischen Molekülen wie c-IAP1 und c-IAP2 (Rothe et al.,

1995a). Der N-Terminus der gesamten TD führt zur Aktivierung von NF κ B oder JNK (Natoli et al., 1997; Rothe et al., 1995b).

Die dritte Gruppe der Mitglieder der TNFR-Superfamilie, in die z.B. Decoyrezeptor (DcR) 1 und 3 oder Osteoprotegerin (OPG) eingeordnet werden, tragen keine funktionalen intrazellulären Signalmotive oder –domänen und können somit auch keine Signale in das Zellinnere weiterleiten. Diese Rezeptoren konkurrieren mit den beiden anderen Rezeptorgruppen um die entsprechenden Liganden und verhindern somit deren Aktivierung und anschließende Signaltransduktion (Dempsey et al., 2003).

1.2 Das LT β R/Ligand-System: Expression und Aktivierung des NF κ B-Signalwegs

Innerhalb der TNF/TNFR-Superfamilie gibt es mehrere Ligand-Rezeptor-Systeme, die miteinander interagieren können. Dazu gehört auch das LT β R/Ligand-System (siehe Abb. 3), zu dem die vier nahe verwandten Liganden LT α , LT β , *lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for binding herpesvirus entry mediator on T cells* (LIGHT) und TNF und die Rezeptoren LT β R, HVEM, TNFR1 und TNFR2 gehören. Des Weiteren sind Interaktionen mit den beiden Rezeptoren BTLA (*B- and T-cell attenuator*) und Decoyrezeptor 3 beschrieben. Im Folgenden wird näher auf die Liganden LT α , LT β und LIGHT und die Rezeptoren LT β R und HVEM eingegangen.

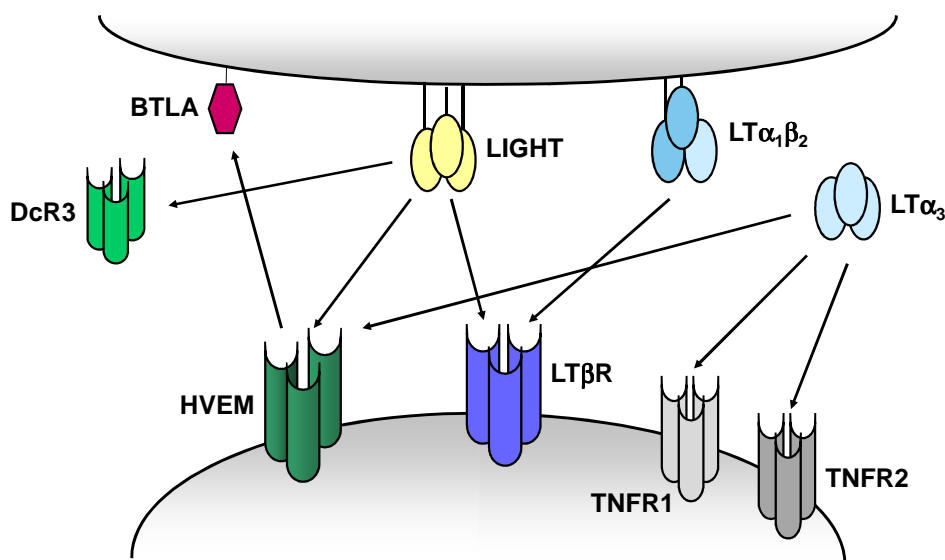


Abb. 3 Übersicht über das LT β R/Ligand-System (modifiziert nach Ware, 2008).

Auf der Seite der Liganden ist zunächst Lymphotoxin zu nennen, von dem es die beiden Formen $LT\alpha$ und $LT\beta$ gibt. $LT\alpha$ (früher als $TNF\beta$ bezeichnet) kommt nur in sezernierter Form vor. Als Homotrimer bindet es an beide TNF-Rezeptoren und an HVEM (Aggarwal et al., 1985; Mauri et al., 1998; Schoenfeld et al., 1991). $LT\beta$, ein 33 kDa großes Protein, konnte bisher ausschließlich membrangebunden nachgewiesen werden und bildet zusammen mit $LT\alpha$ die Heterotrimere $LT\alpha_1\beta_2$ und $LT\alpha_2\beta_1$ (Browning et al., 1993). Letzteres bindet wie $LT\alpha_3$ an beide TNF-Rezeptoren, wird jedoch nur in geringer Menge von T-Zellen exprimiert (Browning et al., 1995). Die biologisch wichtige Form ist das $LT\alpha_1\beta_2$ -Heterotrimer, welches ausschließlich an den $LT\beta R$ bindet (Crowe et al., 1994). Da das $LT\beta$ nicht in eine lösliche Form gespalten wird, benötigt die Aktivierung des $LT\beta R$ über $LT\alpha_1\beta_2$ einen Zell-Zell-Kontakt. Für die Rezeptorspezifität im Heterotrimer ist nicht das $LT\alpha$, sondern allein das $LT\beta$ verantwortlich (Williams-Abbott et al., 1997). Ein weiterer Ligand für den $LT\beta R$ ist das 29 kDa große Protein LIGHT, welches als Homotrimer vorliegt (Mauri et al., 1998). Es kann membrangebunden oder in sezernierter Form biologisch aktiv sein (Ware, 2005). Neben der Bindung an den $LT\beta R$ interagiert LIGHT auch mit HVEM, der zunächst als Rezeptor für das Herpes Simplex Virus beschrieben wurde (Montgomery et al., 1996). Zusätzlich dazu bindet LIGHT an den löslichen Decoyrezeptor 3, wodurch Interaktionen mit HVEM oder $LT\beta R$ unterbunden werden (Yu et al., 1999). Schließlich wurde beschrieben, dass HVEM mit BTLA, einem Rezeptor, der eine hemmende Wirkung vermittelt und dessen extrazelluläre Domäne zur Immunglobulin-Superfamilie gehört, in Wechselwirkung treten kann (Murphy et al., 2006).

Eine Besonderheit des Expressionsmusters von $LT\alpha_1\beta_2$ und $LT\beta R$ ist die strikte Trennung der Zellen, die den Liganden bzw. den Rezeptor tragen. So wird der $LT\beta R$ größtenteils von nicht-hämatopoetischen Zellen (z.B. Fibroblasten oder Epithelzellen) konstitutiv exprimiert. Eine Ausnahme sind Zellen myeloiden Ursprungs, wie z.B. Monozyten, Dendritischen Zellen und Mastzellen, die den $LT\beta R$ ebenfalls tragen (Murphy et al., 1998; Stopfer et al., 2004a). $LT\alpha_1\beta_2$ kommt ausschließlich auf B-, T- und NK-Zellen vor, wobei durch die Aktivierung der Immunzellen durch bestimmte Zytokine und Chemokine die geringe konstitutive Expression des Liganden verstärkt wird (Ansel et al., 2000).

Bei LIGHT und seinen beiden Rezeptoren HVEM und $LT\beta R$ gibt es hingegen keine strikte Trennung des Expressionsmusters. LIGHT ist hauptsächlich auf aktivierten T-Lymphozyten, NK-Zellen und unreifen Dendritischen Zellen zu finden. Während des Reifungsprozesses der Dendritischen Zellen wird die Expression von LIGHT wieder herunter reguliert (Tamada et

al., 2000a). HVEM ist sowohl auf lymphoiden als auch myeloiden Zellen zu finden und wird konstitutiv von naiven $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen exprimiert (Sedy et al., 2005). Während der Anfangsphase der Aktivierung der T-Lymphozyten kommt es zu einer Herunterregulation von HVEM bei einer gleichzeitigen Hochregulation der Expression von LIGHT. Dieser reziproke Mechanismus, bei dem vermutet wird, dass die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor die Herunterregulation von HVEM auslöst, stellt somit ein selbstregulierendes Ligand/Rezeptor-System dar, dass zur T-Zell-Aktivierung beiträgt (Morel et al., 2000).

Wie bereits im Kapitel 1.1 erwähnt, gehören die beiden Rezeptoren $LT\beta R$ und HVEM der zweiten Gruppe der TNFR-Superfamilie an, die keine Todesdomäne tragen und bei denen die Signaltransduktion über TRAFs vermittelt wird. So wurde bisher gezeigt, dass die TRAF-Proteine 2, 3 und 5 an den $LT\beta R$ binden können (Chang et al., 2002). HVEM kann zusätzlich mit dem TRAF-Protein 1 interagieren (Marsters et al., 1997). Bei der Bindung der Liganden an die beiden Rezeptoren $LT\beta R$ und HVEM kommt es zu einer Aktivierung des NF κ B-Signalwegs. NF κ B ist ein eukaryotischer Transkriptionsfaktor, der in allen Zelltypen vorkommt und der 1986 als nukleärer Faktor beschrieben wurde, der für die Transkription der leichten kappa-Kette der Immunglobuline in B-Zellen wichtig ist (Sen et al., 1986). Durch intensive Forschung in den letzten 20 Jahren auf diesem Gebiet weiß man nun, dass die Familie der NF κ B-Transkriptionsfaktoren Hunderte von Genen reguliert, die äußerst wichtig für die Entwicklung von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, sowie für die Bildung der lymphatischen Organe sind. Die NF κ B-Familie besteht aus fünf Mitgliedern. Diese werden als Rel A (p65), Rel B, c-Rel, NF κ B1 (p50 und sein Vorläufer p105) und NF κ B2 (p52 und sein Vorläufer p100) bezeichnet. Sie bilden eine Vielzahl an Homo- und Heterodimeren, die als Aktivatoren, aber auch als Inhibitoren der Transkription wirken können (Ruben et al., 1992; Ryseck et al., 1992). Der typische NF κ B-Komplex ist ein Heterodimer, das aus einem der Rel-Proteine und p50 oder p52 zusammengesetzt ist. Während die Rel-Proteine sowohl eine N-terminale DNA-Bindungsdomäne als auch eine C-terminale Transaktivierungsdomäne besitzen, tragen p50 und p52 nur eine DNA-Bindungsdomäne und modulieren damit die Bindungsaffinität der Rel-Proteine. Allen NF κ B-Proteinen ist gemeinsam, dass sie eine sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD) besitzen, welche die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) beinhaltet und die an der Dimerisierung, der DNA-Bindung und der Interaktion mit den I κ B-Proteinen beteiligt ist (Ghosh et al., 1998). Die I κ Bs, zu denen unter anderem I κ B α gehört, sind spezifische Inhibitoren, die über eine *ankyrin repeat domain* (ARD) an die RHD binden. Dabei wird das NLS abgedeckt und die

NFκB-Dimere werden im Zytoplasma zurückgehalten (Bonizzi et al., 2004b). Neben den IκB-Proteinen gehören auch p100 und p105 zu den Inhibitoren, da sie ebenfalls eine ARD besitzen und so die Translokation der NFκB-Proteine verhindern. Erst nach der Aktivierung des NFκB-Signalwegs wird der C-Terminus abgespalten und p50 oder p52 können mit den entsprechenden Bindungspartnern in den Zellkern translozieren (Sun et al., 2003).

Bei der Aktivierung der NFκB-Proteine unterscheidet man grundsätzlich zwei Signalwege. Der am besten untersuchte ist der **klassische oder auch kanonische NFκB-Signalweg** (siehe Abb. 4), der hauptsächlich durch proinflammatorische Stimuli, wie z.B. TNF oder IL-1, aktiviert wird. Dabei wird zunächst der IKK-Komplex (*IκB inducing kinase complex*) aktiviert, der aus den katalytischen Untereinheiten IKKα und IKKβ und aus der regulatorischen Untereinheit IKKγ (auch bezeichnet als NEMO für *NFκB essential modulator*) besteht (Mercurio et al., 1997). Dies wiederum führt zu einer Phosphorylierung von IκBα an den beiden Aminosäuren Ser32 und Ser36, dann zur Ubiquitinierung und schließlich zur Degradation von IκBα im Proteasom (Brown et al., 1995; Chen et al., 1996). Die dadurch freiwerdenden NFκB-Dimere (beim klassischen NFκB-Signalweg hauptsächlich das p50-Rel A-Heterodimer) können somit in den Zellkern translozieren, an die Ziel-DNA binden und die Transkription aktivieren.

Ein anderer Signalweg der Aktivierung von NFκB ist der **alternative oder nicht-kanonische NFκB-Signalweg** (siehe Abb. 4), der von der NFκB-induzierenden Kinase (NIK) und von IKKα abhängig, von IKKβ und IKKγ jedoch unabhängig ist (Dejardin et al., 2002; Senftleben et al., 2001). Bei diesem Signalweg kommt es zu einer Aktivierung von NIK und anschließend von IKKα. Das Zielmolekül des IKKα-Homodimers ist dabei das p100, das meist an Rel B gebunden ist und die inaktive Form des p52 darstellt. Bei der Aktivierung erfolgt die Phosphorylierung an zwei C-terminalen Seiten von p100, so dass dieses zu p52 prozessiert werden kann. Dies wiederum wird wie schon beim klassischen Signalweg durch eine Ubiquitinierung und den Abbau des Proteins im Proteasom gesteuert (Xiao et al., 2001). Der dadurch freigewordene N-terminale Teil des p100 (p52) kann somit zusammen mit Rel B als Heterodimer in den Zellkern wandern und die Transkription der entsprechenden Zielgene steuern (Dejardin et al., 2002).

Durch die Aktivierung des LTβR können grundsätzlich beide NFκB-Signalwege aktiviert werden. Im Fall des klassischen NFκB-Signalwegs wird nach der Stimulierung des LTβR vor allem die Transkription von proinflammatorischen Genen gesteuert (siehe Abb. 4). Dazu gehören unter anderem Integrine, wie z.B. *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) oder

mucosal addressin vascular cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) (Ettinger et al., 1998). Außerdem werden auch Chemokine, wie z.B. *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 β oder MIP-2 aktiviert (Dejardin et al., 2002; Hehlhans et al., 2003). Dies führt dazu, dass Leukozyten an die Orte der Entzündung gelangen können.

Die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalwegs über den LT β R führt hauptsächlich zur Induktion der Transkription von Genen, die bei der Organisation und Homöostase sekundärer lymphatischer Organe eine wichtige Rolle spielen (siehe Abb. 4). Dazu gehören unter anderem das *secondary lymphoid tissue chemokine* (SLC), *B-lymphocyte chemoattractant* (BLC), *Epstein Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine* (ELC), *stromal derived factor-1* (SDF-1) und *B cell activating factor belonging to the TNF family* (BAFF) (Dejardin et al., 2002).

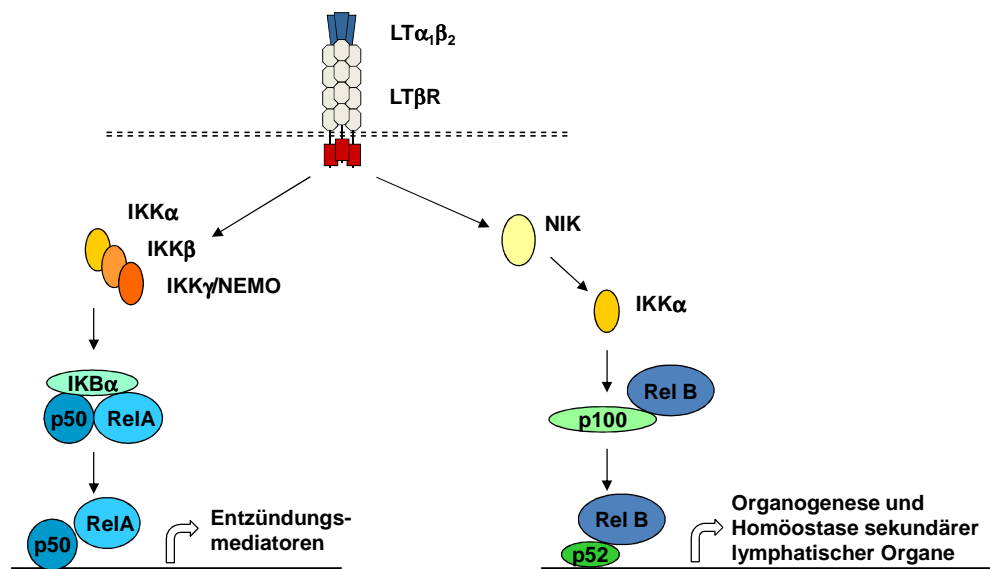


Abb. 4 Die Aktivierung des klassischen und des alternativen NF κ B-Signalwegs nach Stimulation des LT β R (modifiziert nach Hehlhans et al., 2005).

Die Bindung von LIGHT an seinen Rezeptor HVEM kann ebenfalls zu einer Aktivierung von NF κ B führen (Tamada et al., 2000a). Eine genauere Untersuchung, bei der die Aktivierung von HVEM auf Monozyten Gegenstand war, konnte dabei zeigen, dass die Signalweiterleitung bei HVEM wahrscheinlich über den klassischen NF κ B-Signalweg vonstatten geht (Heo et al., 2007).

1.3 Die Funktionen des LT β R/Ligand-Systems

1.3.1 Etablierung und Aufrechterhaltung der Organisation sekundärer lymphatischer Organe

Die wichtigste und wohl auch am besten untersuchte Funktion des LT β R/Ligand-Systems ist die Etablierung und Aufrechterhaltung der Organisation von sekundären lymphatischen Organen wie der Milz, den Lymphknoten oder den Peyerschen Plaques. Dies konnte durch eine Vielzahl von Studien belegt werden, die an LT α -, LT β -, LIGHT- und LT β R-defizienten Mäusen durchgeführt wurden (Gommerman et al., 2003a). So haben die LT α -defizienten Mäuse keine Lymphknoten und Peyerschen Plaques und die Organisation der Milzstruktur ist sehr stark beeinträchtigt (Banks et al., 1995; De Togni et al., 1994). LT β R-defiziente Mäuse zeigen einen Phänotyp, der dem der LT α -defizienten Mäuse sehr ähnlich ist (Futterer et al., 1998). Den LT β -defizienten Mäusen fehlen ebenfalls alle peripheren Lymphknoten und Peyerschen Plaques, die mukosalen und zervikalen Lymphknoten sind jedoch noch vorhanden. Außerdem ist die Struktur der Milz weniger stark beeinträchtigt, als dies z.B. bei den LT β R^{-/-}-Mäusen der Fall ist (Alimzhanov et al., 1997). Im Gegensatz zu den LT α -defizienten Mäusen, haben die LIGHT^{-/-}-Mäuse normal entwickelte sekundäre lymphatische Organe (Scheu et al., 2002). Dies weist darauf hin, dass für die Organisation der korrekten Lymphorganstrukturen vorwiegend die Interaktion zwischen LT $\alpha_1\beta_2$ und dem LT β R wichtig ist. Auf der anderen Seite gibt es jedoch auch eine Untersuchung, bei der gezeigt werden konnte, dass die transgene Expression von LIGHT in LT α -defizienten Mäusen wieder dazu führt, dass sich die T- und B-Zellzonen, die Follikulären Dendritischen Zellen (FDC) und die Keimzentren, nicht aber der Randbereich der weißen Pulpa, wieder normal organisieren (Wang et al., 2002). Dies deutet darauf hin, dass LIGHT den Verlust einiger Funktionen von LT $\alpha\beta$ in der Gegenwart des LT β R kompensieren kann. LIGHT, das wie bereits erwähnt größtenteils von T-Lymphozyten exprimiert wird, dient jedoch hauptsächlich als kostimulatorisches Molekül, was z.B. durch eine Studie belegt wurde, bei der die Proliferation von CD8⁺-Zellen und die IL-2-Sekretion von CD4⁺-Zellen in LIGHT-defizienten Mäusen verringert ist (Scheu et al., 2002).

Die lymphatischen Strukturen können ebenfalls durch eine Behandlung von Mäusen mit einem Inhibitor der LT β R-Aktivierung, dem LT β R-Ig, in ihrer Struktur beeinträchtigt werden. Das LT β R-Ig ist ein Fusionsprotein zwischen der extrazellulären Domäne des LT β R und dem Fc-Teil des humanen Immunglobulin G (IgG₁), das an beide Liganden des LT β R (LIGHT und LT $\alpha_1\beta_2$) binden kann, und somit dessen Aktivierung verhindert (Browning, 2008). Daher sind

die Effekte, die man bei Mäusen durch die Behandlung mit diesem LT β R-Inhibitor beobachten kann, das Ergebnis der Hemmung beider LT β R-Liganden. Die Auswirkungen der LT β R-Ig-Gabe sind je nach Behandlungszeitpunkt unterschiedlich stark ausgeprägt. So verhindert die Applikation des Fusionsproteins bei Mäusen in der Tragezeit die Bildung von Peyerschen Plaques und von Lymphknoten bei den Jungtieren (Rennert et al., 1996). Die Behandlung im Erwachsenenstadium führt hingegen nur zu einer Veränderung der Organisation der lymphatischen Organe (Spahn et al., 2005).

Der Mechanismus, durch den die Entwicklung im Embryonalstadium und die Aufrechterhaltung der Struktur lymphatischer Organe gesteuert wird, basiert hauptsächlich auf der Regulation der Expression von Chemokinen, wie z.B. CXCL13 (= BLC), CCL19 (= ELC) und CCL21 (= SLC), durch den LT β R-Signalweg (Muller et al., 2003). Bei der Bildung von Lymphknoten oder den Peyerschen Plaques wandert zunächst eine Population von Zellen, die aus der fötalen Leber stammen, in die Anlagen der lymphatischen Organe ein (Hashi et al., 2001). Diese *lymphoid tissue-inducing cells* (LTIC) sind positiv für CD45, IL7R α und $\alpha_4\beta_7$. Nach Stimulation mit IL-7 exprimieren sie außerdem LT $\alpha_1\beta_2$, das mit mesenchymalen LT β R-tragenden Zellen in den Anlagen interagiert (Honda et al., 2001). Dadurch kommt es zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und Chemokinen wie CXCL13 und CCL19 in den mesenchymalen Zellen. Dies wiederum löst eine verstärkte Wanderung von LTICs in die Anlagen der lymphatischen Organe aus. Somit entsteht eine positive Rückkopplungsschleife, durch die schließlich die Grundstruktur, z.B. eines Lymphknotens, entsteht. Durch die Expression von Chemokinen wird, wie schon erwähnt, auch die Feinorganisation und Aufrechterhaltung der lymphatischen Organe gesteuert (Muller et al., 2003). So ist die Interaktion des LT β R mit LT $\alpha_1\beta_2$ wichtig für die Wanderung von Zellen aus den lymphatischen Gefäßen in die Lymphknoten durch sogenannte *high endothelial venules* (HEV), da es durch die Aktivierung des LT β R zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen in den HEVs kommt (Browning et al., 2005). Das Chemokin CXCL13 ist verantwortlich für die richtige Positionierung von B-Zellen in den Follikeln von Lymphknoten oder Milz. Dabei induziert es nicht nur die Chemotaxis, sondern führt auch zu einer Hochregulation von LT $\alpha_1\beta_2$ in den B-Zellen. Dadurch wird wiederum die Expression von CXCL13 in den follikulären DCs erhöht, was wie schon bei der Bildung der lymphatischen Organe eine positive Rückkopplung darstellt (Ansel et al., 2000). Ähnlich wie in der B-Zell-Zone gibt es auch in der T-Zell-Zone eine solche Amplifikationsschleife. Dabei exprimieren LT β R-tragende Stromazellen CCL19 und CCL21. Beide Chemokine führen zu

einer erhöhten Einwanderung von T-Lymphozyten und DCs in die T-Zell-Zone (Luther et al., 2002) und zu einer erneuten Hochregulation von $LT\alpha_1\beta_2$ auf den T-Lymphozyten (Luther et al., 2000).

1.3.2 Abwehr von viralen, bakteriellen und parasitären Infektionen

Neben seiner Funktion bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung lymphatischer Organe spielt das $LT\beta R$ /Ligand-System eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Infektionen, die durch Viren, Bakterien oder Parasiten hervorgerufen werden. Dabei ist der $LT\beta R$ -Signalweg bei den Infektionen auf unterschiedliche Art und Weise beteiligt. Für die Immunantwort wird zum einen eine korrekte Struktur der lymphatischen Organe benötigt, zum anderen ist bei manchen Infektionen die Aktivierung von Effektorfunktionen durch die Stimulation des $LT\beta R$ elementar.

So gibt es beispielsweise einige Studien, die sich mit der Rolle von Lymphotoxin bei **viralen Infektionen** beschäftigen. $LT\alpha$ -defiziente Mäuse, die mit dem lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV) infiziert wurden, zeigen eine starke Beeinträchtigung bei der Aktivierung und Expansion von virusspezifischen $CD8^+$ T-Lymphozyten in der Milz (Suresh et al., 2002). Das Fehlen von $LT\alpha$ führt dabei nur indirekt durch die zerstörte Milzstruktur zur verringerten T-Zellantwort. Außerdem entwickeln $LT\alpha^{-/-}$ -Mäuse bei der Infektion mit Herpesviren (HSV-1) zwar eine normale Anzahl an $CD8^+$ T-Lymphozyten, die Zytotoxizität und bestimmte Effektorfunktionen sind jedoch beeinträchtigt, so dass die Tiere anfälliger für eine Enzephalitis sind (Kumaraguru et al., 2001). Bei der Infektion von $LT\alpha$ -defizienten und $LT\beta R$ -Ig transgenen Mäusen mit Cytomegalieviren (CMV) zeigt sich eine erhöhte Sterblichkeit der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (Benedict et al., 2001). Dagegen ist die Immunantwort bei $LT\alpha$ -defizienten Mäusen nach einer Influenzainfektion nur wenig beeinträchtigt, da die spezifische T-Zellantwort mit einer geringen Zeitverzögerung auftritt (Lund et al., 2002).

Neben der Abwehr von Viren sind auch einige **bakterielle Infektionen** von einem funktionierendem $LT\beta R$ /Ligand-System abhängig. Bei der Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* haben $LT\alpha^{-/-}$, $LT\beta^{-/-}$ und $LT\beta R^{-/-}$ -Mäuse eine erhöhte Anzahl an Bakterien in Lunge und Leber und zeigen damit auch eine geringere Überlebensrate im Vergleich zum Wildtyp (Ehlers et al., 2003). Dagegen verhalten sich LIGHT-defiziente Mäuse bei einer Infektion mit *M. tuberculosis* genauso wie die Wildtypkontrolle. Somit ist die Interaktion zwischen $LT\alpha_1\beta_2$ und dem $LT\beta R$ bei der Abwehr dieses Bakteriums wichtig. In einer anderen

Studie, bei der Knochenmarkschimären verwendet wurden, konnte im Unterschied zur oben genannten Veröffentlichung gezeigt werden, dass LT β -defiziente Mäuse im Gegensatz zu den LT α -defizienten Mäusen nicht anfällig für eine Infektion mit *M. tuberculosis* sind (Roach et al., 2001). Dabei bilden sich bei den LT α ^{-/-}-Mäusen in der Lunge unstrukturierte Granulome, in denen nur Makrophagen, aber keine T-Lymphozyten zu finden sind. Dies weist darauf hin, dass LT α besonders während der Immunantwort gegen *M. tuberculosis* wichtig ist. Die Defekte der sekundären lymphatischen Organe spielen hier hingegen nur eine untergeordnete Rolle. Weiterhin zeigen Mäuse, die mit LT β R-Ig Fusionsprotein behandelt wurden, eine erhöhte Anfälligkeit für eine Infektion mit *M. bovis* (BCG), da ebenfalls die Bildung von Granulomen (hauptsächlich in der Milz) beeinträchtigt ist und die Tiere eine höhere bakterielle Last haben als die Kontrollgruppe (Lucas et al., 1999). Auch bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* wiesen die untersuchten LT β R-defizienten Mäuse eine erhöhte Sterblichkeit gegenüber den Kontrollmäusen auf (Ehlers et al., 2003). Schließlich nimmt eine Infektion mit *Citrobacter rodentium* sowohl bei LT α ^{-/-}-, LT β ^{-/-}- oder bei LT β R^{-/-}-Mäusen einen tödlichen Verlauf, wobei sich die Bakterien vor allem in Leber und Milz vermehren (Spahn et al., 2004).

Um die Abhängigkeit der Abwehr von **Parasiten** zu untersuchen, wurden unter anderem Infektionen mit *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* und *Trypanosoma brucei* in LT α - oder LT β -defizienten Mäusen durchgeführt. LT α ^{-/-}-Mäuse sind sehr anfällig für eine Infektion mit *T. gondii*, wobei die Tiere an einer durch den Parasiten ausgelösten Enzephalitis sterben (Schluter et al., 2003). Die im Leishmaniosemodell verwendeten LT β -defizienten Mäuse hatten ebenfalls eine stark verringerte Überlebensrate im Vergleich zu Kontrolltieren. Bei dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass die richtige Organisation der Lymphknoten und nicht die Expression von LT β selbst für eine Abwehr von *L. major* wichtig ist (Wilhelm et al., 2002). Schließlich wurden LT α -defiziente Mäuse auch mit *T. brucei* infiziert. Hier hatten die Tiere einen geringen Überlebensvorteil im Vergleich zur Kontrollgruppe (Magez et al., 2002).

1.3.3 Autoimmunerkrankungen

Die Beteiligung des LT β R/Ligand-Systems an der Ausprägung und am Fortschreiten von Autoimmunerkrankungen ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung. In einem Tiermodell der Collagen-induzierten Arthritis (CIA), welches Ähnlichkeiten zur humanen rheumatoiden Arthritis aufweist, konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die einige Wochen vor der Auslösung

der Krankheit mit LT β R-Ig behandelt wurden, keine Arthritis entwickelten (Fava et al., 2003). Bei gleichzeitiger Gabe des Fusionsproteins und Induktion der CIA entwickelte sich die Krankheit in einer milder Form. Außerdem kann die Behandlung mit LT β R-Ig eine bereits etablierte Arthritis wieder unterdrücken. Das Modell der *experimental autoimmune encephalomyelitis* (EAE) stellt eine T-Zell-vermittelte Krankheit des zentralen Nervensystems dar. In einer Studie führte die Behandlung von Mäusen mit LT β R-Ig zum Schutz vor einer EAE (Gommerman et al., 2003b). Daraus wurde abgeleitet, dass LT $\alpha\beta$ eine Rolle bei der T-Zell-Antwort übernimmt. Da außerdem gezeigt wurde, dass nach LT β R-Ig-Gabe keine sekundäre T-Zell-Antwort auf EAE-Autoantigene mehr möglich war, wird für LT $\alpha\beta$ eine Beteiligung bei der Reifung von T-Lymphozyten vermutet. Der Insulin-abhängige Diabetes Mellitus (IDDM) ist eine Autoimmunkrankheit, die durch eine selektive Zerstörung von Insulin-sekretierenden β -Zellen charakterisiert ist. Als Modell für IDDM werden Mäuse verwendet, die spontan in einem bestimmten Alter Diabetes entwickeln (*nonobese diabetic*- oder NOD-Mäuse). Dabei führt die Einwanderung von autoreaktiven T-Lymphozyten in die Langerhansschen Inseln zu einem Fortschreiten der Krankheit. In zwei verschiedenen Studien zeigte sich, dass die Entwicklung von Diabetes in den NOD-Mäusen durch die Gabe von LT β R-Ig verhindert werden kann (Ettinger et al., 2001; Wu et al., 2001). Da hierbei jeweils ein unterschiedlicher Experimentaufbau verwendet wurde, herrscht Unklarheit über die Wirkungsweise der Behandlung mit LT β R-Ig Fusionsprotein. Zum einen könnte die Verhinderung von Diabetes durch eine Hemmung der Aktivierung von T-Zellen zustande kommen (Wu et al., 2001). Zum anderen könnte auch die Regulation der Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die wichtig für die Entwicklung der lymphatischen Organe sind, beeinflusst sein (Ettinger et al., 2001). In den letzten Jahren zeigte sich außerdem immer deutlicher, dass das LT β R/Ligand-System eine wichtige Rolle im Darm und entzündlichen Darmerkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn, spielt. So führt die Behandlung mit LT β R-Ig Fusionsprotein zu einer Hemmung der T-Zell-vermittelten Darmentzündung in unterschiedlichen Mausmodellen, wie im Transfermodell mit CD45RB^{high}CD4⁺ T-Lymphozyten (Mackay et al., 1998) oder der mit *dextrane sodium sulfate* (DSS) induzierten chronischen Kolitis (Stopfer et al., 2004b). Durch die Gabe von LT β R-Ig bei einer akuten DSS-induzierten Kolitis wird die Entzündung hingegen verschlimmert. Den gleichen Effekt kann man beobachten, wenn man LT β R^{-/-}- oder LT $\alpha\beta$ ^{-/-}-Mäuse für die Versuche verwendet (Jungbeck et al., 2008). LIGHT-defiziente Mäuse hingegen zeigen in der akuten DSS-induzierten Kolitis kaum Anzeichen einer Entzündung. Ebenso führt die Behandlung mit

LIGHT-neutralisierenden Antikörpern zu einer Verbesserung des Krankheitsbilds (Manuskript in Vorbereitung). Ein komplementäres Ergebnis erhält man bei LIGHT-transgenen Mäusen. Diese entwickeln spontan chronische Entzündungen, die sich speziell im Darmtrakt manifestieren und dem Krankheitsbild von Morbus Crohn Patienten gleichen (Shaikh et al., 2001). Schließlich konnte in verschiedenen Modellen der *graft-versus-host-disease* (GVHD) gezeigt werden, dass durch die Blockade des LIGHT-HVEM-Signalwegs z.B. die allogene T-Zellantwort *in vitro* oder die Ausprägung der GVHD in Mäusen verhindert wird (Harrop et al., 1998b; Tamada et al., 2000b).

1.4 Die Rolle des LT β R bei Tumorwachstum und Angiogenese

Trotz großer Anstrengungen in der Forschung bleibt Krebs bis heute eine Krankheit, die nur schwer heilbar ist. Obwohl bereits eine Vielzahl von Behandlungsmethoden, wie z.B. die Chemotherapie oder die Verabreichung von therapeutischen Antikörpern, entwickelt bzw. verbessert wurden und obwohl eine Diagnose durch bestimmte Tumormarker schon in immer früheren Stadien möglich ist, sind Tumorerkrankungen neben Herz-Kreislaufkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland die häufigste Todesursache. Heute wird Krebs als eine multifaktorielle Erkrankung angesehen, die sehr unterschiedlich ausgeprägt ist. Daher muss, um ein optimales Ergebnis zu erhalten, jede Tumorart mit einer speziellen Therapie behandelt werden. Unter anderem werden dabei die multifunktionellen Zytokine der TNF-Superfamilie als potentielle therapeutische Reagenzien angesehen. Diese können auf zwei verschiedene Arten wirken: zum einen direkt auf die Tumorzellen durch Induktion der Apoptose und zum anderen indirekt durch die Beeinflussung des den Tumor umgebenden Gewebes. Letzteres soll vor allem durch die Verhinderung der Tumorangiogenese oder durch die Förderung der Induktion einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort erreicht werden. (Wajant et al., 2005)

Neben genetischen und epigenetischen Änderungen, die dazu beitragen, dass eine Zelle entartet, ist noch ein weiterer Schritt notwendig, um die Entwicklung eines Tumors voranzutreiben. Dies ist die Induktion eines Gefäßsystems im Tumor, das als *angiogenic switch* bezeichnet wird (Hanahan et al., 2000). In der ersten Phase der Entstehung ist ein Tumor noch sehr klein (1-2 mm Durchmesser) und benötigt daher keine Blutgefäße. In diesen Läsionen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose. Ein solcher Tumor wird als *dormant*, also schlafend, bezeichnet. In der zweiten Phase, deren Start der *angiogenic switch* darstellt, kommt es zur Bildung von Blutgefäßen und zum exponentiellen Wachstum

(Bergers et al., 2003). Im gesunden Organismus wird die Angiogenese von einer Reihe von Faktoren kontrolliert. Dabei halten sich anti- und proangiogene Faktoren die Waage. Auf der Seite der Aktivatoren der Angiogenese sind Moleküle zu finden, wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF) oder *epidermal growth factor* (EGF) (Dvorak, 2002). Letzterer führt unter anderem zu einer erhöhten Expression von VEGF, FGF und dem ebenfalls proangiogenen Interleukin-8 (IL-8). Auf der Seite der Inhibitoren der Angiogenese stehen Moleküle, wie Thrombospondin-1, Angiostatin oder Endostatin (O'Reilly, 1997; O'Reilly et al., 1997; Volpert et al., 1995). Beim *angiogenic switch* kommt es durch verschiedenste Stimuli zu einer verstärkten Expression proangiogener Faktoren und damit zu einer beginnenden Vaskularisierung des Tumorgewebes. Diese verläuft im Tumor nicht zielgerichtet, sondern führt zu unregelmäßig geformten, unorganisierten Blutgefäßen (Bergers et al., 2003).

Nach der Entdeckung von VEGF (Leung et al., 1989) zeigte sich, dass es eines der Moleküle ist, die in großem Umfang zur Tumorangiogenese beitragen (Dvorak, 2002). So gibt es bereits einen humanisierten monoklonalen Antikörper gegen VEGF, der erfolgreich in Kombination mit Chemotherapeutika bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen eingesetzt wird (Fernando et al., 2004).

In den letzten Jahren konnte jedoch nachgewiesen werden, dass IL-8 ebenfalls das Tumorstadium beeinflusst. Ursprünglich wurde IL-8 als chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten beschrieben (Baggiolini et al., 1992). Außerdem gehört es zur Gruppe der CXC Chemokine und wird in der systematischen Einteilung als CXCL8 bezeichnet (Zlotnik et al., 2000). Neben seiner chemotaktischen Funktion wird IL-8 auch in einer großen Zahl humaner Tumore, wie z.B. in Kolon- und Ovarialkarzinomen, als proangiogener Faktor exprimiert. In verschiedenen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Menge an exprimiertem IL-8 und der Schwere der Tumorerkrankung hergestellt werden, d.h. die IL-8-Expression im Tumorgewebe wird als prognostischer Marker angesehen (Xie, 2001). So zeigte z.B. eine 2008 erschienene Veröffentlichung, in der Daten von Ovarialkarzinompatientinnen aus einem Zeitraum von 20 Jahren ausgewertet wurden, dass eine erhöhte IL-8-Expression mit einer schlechten klinischen Prognose einhergeht (Merritt et al., 2008). Außerdem wurde ein neutralisierender anti-IL8 Antikörper hergestellt, der zur Behandlung von Melanomen oder anderen soliden Tumoren allein oder in Kombination mit konventioneller Chemotherapie verwendet werden soll (Huang et al., 2002). Dieser Antikörper ist jedoch noch nicht im Handel erhältlich. Bei der Untersuchung der Regulation

der IL-8-Expression zeigte sich, dass viele Tumorzellen das Chemokin bereits konstitutiv exprimieren. Stressfaktoren wie Hypoxie oder Azidose können die Expression von IL-8 noch weiter erhöhen. Der Promotor des IL-8-Gens beinhaltet unter anderem eine AP-1- und eine NFκB-Bindungsstelle (Mukaida et al., 1994), wobei letztere vor allem für die transkriptionale Regulation wichtig ist (Hoffmann et al., 2002). IL-8 kann außerdem an zwei verschiedene Rezeptoren, CXCR1 und CXCR2, binden. Dabei scheint hauptsächlich die Aktivierung von CXCR2 wichtig für die Progression des Tumorwachstums zu sein (Varney et al., 2006)

Als funktionelles Homolog des humanen IL-8 wurde das murine MIP-2 beschrieben (Keane et al., 1999). Es gehört ebenfalls zur Gruppe der CXC Chemokine und wirkt wie IL-8 chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten (Driscoll et al., 1995). Neben dieser Funktion wird es auch im Zusammenhang mit der Induktion von Melanomen und der Förderung des Wachstums von Lebermetastasen beschrieben (Kollmar et al., 2006; Yang et al., 2001). Genauso wie das humane IL-8 beinhaltet der Promotor des murinen MIP-2 eine NFκB-Bindungsstelle, die für die LPS-induzierte Expression in Makrophagen und für die konstitutive Expression in Melanomzellen verantwortlich ist (Widmer et al., 1993).

Die Aktivierung des NFκB-Signalwegs spielt neben der Kontrolle der Expression einer Vielzahl von Genen, die unter anderem für den Zellzyklus und die Apoptose wichtig sind, auch eine zentrale Rolle bei der Initiation und Progression von Tumorerkrankungen. So haben Genexpressionsstudien gezeigt, dass der NFκB-Signalweg in humanen Tumoren oft konstitutiv aktiviert ist und somit Gene, die für das Fortschreiten der Erkrankung entscheidend sind, exprimiert werden (Basseres et al., 2006). Auch in diesem Bereich der Forschung gibt es Ansätze, bei denen unter anderem Inhibitoren des NFκB-Signalwegs verwenden werden, um Tumorerkrankungen zu behandeln und in den Tumorzellen die Apoptose auszulösen (Umezawa, 2006). Dabei kommen von Tumor zu Tumor unterschiedliche Schritte der NFκB-Aktivierung als Ziel für die Hemmung in Frage. Die meisten bis jetzt erhältlichen Inhibitoren greifen bei der Phosphorylierung von IκBα (IKK-Inhibitoren), bei der Degradierung von IκBα (Proteasom-Inhibitoren) oder nukleären Translokation ein (Sun et al., 2003). Neben der direkten Hemmung der NFκB-Signalwege ist ein weiterer Ansatz in der Tumorthherapie die Identifizierung tumorspezifischer Schritte der NFκB-Aktivierung. Dazu gehört unter anderem die Aktivierung von Zytokinrezeptoren, die im Tumorgewebe verstärkt exprimiert werden und die Signale in das Zellinnere über den NFκB-Signalweg vermitteln. Mit einer spezifischen Blockade dieser Zytokinrezeptoren könnte der NFκB-Signalweg und somit auch das Tumorwachstum gehemmt werden.

In unterschiedlichen Studien und Tumormodellen zeigte sich, dass die Aktivierung des LT β R eine Rolle im Tumorwachstum zu spielen scheint. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bis dato jedoch nicht eindeutig geklärt.

Einerseits wird beschrieben, dass die Aktivierung des LT β R mit rekombinantem LT $\alpha_1\beta_2$ in Kombination mit IFN γ zum Absterben bestimmter Karzinomzelllinien führt (Browning et al., 1996). Dieser Effekt konnte auch beobachtet werden, wenn man die Zelllinien zusammen mit LIGHT und IFN γ kultiviert (Harrop et al., 1998a). Bei der Verwendung von unterschiedlichen LIGHT-Mutanten wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen LIGHT und dem LT β R und nicht mit HVEM für die Apoptose der Tumorzellen verantwortlich ist (Rooney et al., 2000). Der Mechanismus, der dem Absterben der Karzinomzelllinien zugrunde liegt, ist die Anlagerung von TRAF 3 an den LT β R nach dessen Stimulierung. TRAF 3 führt dabei nicht wie die anderen TRAF-Proteine zu einer Aktivierung des NF κ B-Signalwegs (Takeuchi et al., 1996), sondern zum LT β R-vermittelten Zelltod (Force et al., 1997; Force et al., 2000). Somit kann der LT β R die Apoptose von Zellen auslösen, obwohl er zur zweiten Gruppe der TNFR-Superfamilie gehört, welche keine Todesdomänen aufweisen.

Andererseits wurde berichtet, dass die Stimulierung des LT β R in humanen Melanomzelllinien zur Aktivierung des NF κ B-Signalwegs und zur Proliferation der Tumorzellen führt (Dhawan et al., 2008). Vorarbeiten aus unserer eigenen Arbeitsgruppe zeigen außerdem, dass es durch die Aktivierung des LT β R auf Maus-Fibrosarkomzellen zu einer erhöhten Expression des proangiogenen MIP-2 *in vitro* kommt. Zusätzlich dazu ist das Wachstum von Tumoren aus der Fibrosarkomzelllinie auf Mäusen, die defizient für den Liganden LT $\alpha_1\beta_2$ (LT $\alpha\beta^{-/-}$) sind, verlangsamt. Somit führt die Aktivierung des LT β R zu einer Verstärkung des Tumorwachstums durch die Induktion von proangiogenem MIP-2 im Maus-Fibrosarkom-Tumormodell (Hehlgans et al., 2002).

Neben der Aktivierung des LT β R kann LIGHT auch über seinen zweiten Rezeptor HVEM eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort auslösen, die durch zytotoxische T-Zellen vermittelt wird. Hierbei spielt nicht die direkte Induktion der Apoptose von Zellen durch Inkubation mit LIGHT eine Rolle, sondern „anti-Tumor“ Effekte, die *in vivo* beobachtet wurden. So führte die Expression von LIGHT innerhalb eines Tumors durch eine Injektion mit einem speziellen Vektor zu einer Erhöhung der durch zytotoxische T-Zellen vermittelten Immunantwort (Tamada et al., 2000b). Damit kann LIGHT über seine kostimulatorischen Eigenschaften und seine Bindung an HVEM eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort induzieren.

1.5 Ziel der Arbeit

Der LT β R, ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, interagiert funktionell sowohl mit dem auf aktivierten, hämatopoetischen Zellen exprimierten Liganden LT $\alpha_1\beta_2$ als auch mit LIGHT. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Aktivierung des LT β R für das Tumorstadium eine entscheidende Rolle spielt.

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst die notwendigen Reagenzien zum Nachweis, zur Aktivierung und zur Hemmung des LT β R hergestellt werden, um die funktionelle Wichtigkeit einer Aktivierung des LT β R im Maus-Tumormodell zu prüfen.

Mittels shRNA sollte die Expression des LT β R auf Mausfibrosarkomzellen (BFS-1) stabil herunter reguliert werden und die Auswirkungen auf die NF κ B-Aktivierung und die Expression von proangiogenem MIP-2 untersucht werden. Zudem sollte analysiert werden, welcher der beiden möglichen NF κ B-Signalwege (klassischer oder alternativer) nach der Stimulierung des LT β R in den Mausfibrosarkomzellen aktiviert wird. Die beiden Signalwege sollten durch Transfektion mit spezifischen Inhibitoren für den klassischen oder den alternativen NF κ B-Weg gehemmt werden, um den Einfluss der beiden Signalwege auf die Expression des proangiogenen MIP-2 *in vitro* und das Tumorstadium *in vivo* zu analysieren.

Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass die Aktivierung des LT β R auch im humanen System eine Rolle beim Tumorstadium durch die Induktion von proangiogenem IL-8 spielt. In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden, inwieweit der LT β R auf primären humanen Tumorstadien (Kolon- und Ovarialkarzinom) exprimiert wird und sich eine IL-8-Expression nach der Aktivierung des LT β R induzieren lässt. Für diese Untersuchungen sollten zunächst geeignete Antikörper hergestellt werden. Mit diesen Reagenzien sollte sowohl die Expression des LT β R auf humanen Tumorstadien und primärem Tumormaterial durchflusszytometrisch und immunhistochemisch untersucht und Konsequenzen der LT β R-Aktivierung in funktionellen Tests (IL-8-Expression, NF κ B-Aktivierung) nachgewiesen werden. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, welcher der beiden NF κ B-Signalwege bei der Induktion von proangiogenem IL-8 in humanen Tumorstadien nach der Stimulierung des LT β R aktiviert wird.

2 Material

2.1 Geräte

Analysenwaage CP 224S	Sartorius, Göttingen
Bakterienschüttler mit Heizhaube	Vitaris, Baar, Schweiz
BD LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Blotapparatur Fastblot B34	Biometra, Göttingen
Filmentwickler Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Heidelberg
Geldokumentation GeneGenius	Syngene, Cambridge, UK
Gelelektrophorese-Apparaturen	Biorad, München
Geltrockner Slab Dryer Model 483	Biorad, München
iCycler (für quantitative PCR)	Biorad, München
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Kreisschüttler GFL-3015	Omnilab, Mettmensstetten
Luminometer Glomax	Promega, Mannheim
Magnetrührer MR2002	Heidolph, Schwabach
Microtom HM 400	Leica, Heidelberg
Microplate Reader E _{max}	Molecular Devices, München
Mikroskop Diaplan	Olympus, Hamburg
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Mini PROTEAN Electrophoresis System	Biorad, München
Netzgerät PowerPac 300	Biorad, München
Netzgerät PowerPack P25 T	Biometra, Göttingen
Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
PCR-Gerät MyCycler	Biorad, München
pH-Meter Inolab	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accujet pro	Brand, Wertheim
Proteinaufreinigungsanlage Econo System	Biorad, München
Schieblehre	Kern, Balingen-Frommern
Sterilbank HERAsafe KS	ThermoScientific, Karlsruhe
Stickstofftank	German Cryo, Jüchen

Thermoblock Bio TDB-100	Biometra, Göttingen
ThermoShaker TS-100	Biometra, Göttingen
Ultraschallstab Sonifier 450	Branson, Danbury, USA
Vortex MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Waage PJ400	Mettler-Toledo, Gießen
Wärmeschrank	WTB Binder, Tuttlingen
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5417R,	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sorvall RC 6	ThermoScientific, Karlsruhe
Zytozentrifuge Shandon Cytospin 4	ThermoScientific, Karlsruhe

2.2 Verbrauchsmaterial

Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Deckgläser (Automat Star)	Engelbrecht, Edermünde
Dialysemembran Type 20	Biomol, Hamburg
Eppendorfcups (1,5 ml/ 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen BD Falcon	BD Biosciences, Heidelberg
Gewebekulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Glassäule zur Proteinaufreinigung (Ni-NTA)	Biorad, München
HiTrap Protein G HP Sepharosesäule	GE Healthcare, München
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nunc, Langenselbold
Mikropistill	Hartenstein, Würzburg
Mikrotiterplatten Micro Well	Nunc, Langenselbold
Multiwell-Platten (6, 12, 24, 48 und 96)	BD Biosciences, Heidelberg
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, München
Objektträger (geschnitten, Matt-Rand)	Engelbrecht, Edermünde
Papierfilter für Zytospin	Labonord, Mönchengladbach
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10, 200 und 100 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF Transfermembran Immobilon	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen

Serologische (sterile) Pipetten (5, 10 und 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen BD Plastipak	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter Bottle Top 75 mm Nalgene	Nunc, Langenselbold
Zellkulturflaschen BD Falcon (25, 75 und 175 cm ²)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb Cell Strainer 40 µm	BD Biosciences, Heidelberg

2.3 Chemikalien, Medien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	PAN Biotech, Aidenbach
Acrylamid/ Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose, electrophoresis grade	Bio&Sell, Nürnberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
BD OptEIA Substrat Reagent A und B	BD Biosciences, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie (Brilliant) Blue	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM (low glucose)	PAA Laboratories, Cölbe
DNA Standard (100 bp und 1 kb Ladder)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
Entellan	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	PAN Biotech, Aidenbach
Hämalaun	Merck, Darmstadt
HAT-Supplement	PAN Biotech, Aidenbach
HT-Supplement	PAN Biotech, Aidenbach
Immersionsöl Immersol 518 F	Zeiss, Oberkochen
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Ketaminhydrochlorid 5 %	WDT, Garbsen
Magermilchpulver	Granovita, Lüneburg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Neomycin (G418)	PAN Biotech, Aidenbach
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
NOWA Solution A und B	MoBiTec, Göttingen
Nukleasefreies Wasser	Promega, Mannheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
p-Nitrophenyl-Phosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyethylenglycol (PEG) 1500	Roche Diagnostics, Mannheim
Precision Plus Protein All Blue Standard	Biorad, München
Protein Assay	Biorad, München
Rinderserum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Cölbe
RNAlater	Ambion, Huntington, UK
RPMI 1640 Fertigmedium	PAN Biotech, Aidenbach
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Titermax Gold Adjuvant	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIzol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylazinhydrochlorid 2 %	cp-pharma, Burgdorf
Zeocin	InvivoGen, San Diego, USA

Alle nicht aufgeführten Lösungsmittel oder Feststoffe wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.4 Puffer und Lösungen

Abstopplösung für ELISA	2 N H ₂ SO ₄
AP-Substratlösung für ELISA	0,06 % p-Nitrophenylphosphat in AP-Substratpuffer

AP-Substratpuffer für ELISA	9,8 % Diethanolamin 24 mM MgCl ₂ (pH 9,8)
Beschichtungspuffer für ELISA	50 mM NaHCO ₃ (pH 9,2)
Blockierlösung für ELISA	1 % BSA in PBS-T oder TBS-T
Blockierlösung für Western Blot	5 % Magermilchpulver in TBS-T
Blotpuffer (10x)	2 M Glycin 250 mM Tris
Coomassie-Entfärbelösung	10 % Essigsäure 40 % Ethanol
Coomassie-Färbelösung	10 % Essigsäure 40 % Ethanol 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250
Einfriermedium für Zellen (2x)	20 % DMSO 80 % FKS
Elutionspuffer für Ni-NTA-Aufreinigung (nativ)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 150 mM Imidazol pH 8,0 (NaOH)
Elutionspuffer (IgG-Reinigung)	0,1 M Glycin (pH 3,1)
FACS-Puffer	2 % FKS in PBS
HBS-Puffer (pH 7,4)	20 mM HEPES 150 mM NaCl
Lämmli-Auftragspuffer (4x)	0,5 M Tris, pH 6,8 40 % Glycin 0,04 % 2-Mercaptoethanol 4 % SDS 0,005 % Bromphenolblau
Lämmli-Elektrodenpuffer (5x)	120 mM Tris Base 0,95 M Glycin 0,5 % SDS

Loading Dye Solution (6x)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 30 % Glycerol in H ₂ O
Lysepuffer für Ni-NTA-Aufreinigung (nativ)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8,0 (NaOH)
Neutralisationspuffer (IgG-Reinigung)	1 M Tris-HCl (pH 11)
PBS (pH 7,3)	137 mM NaCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl
PBS-T	0,05 % Tween 20 in PBS-Puffer
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
TBS-Puffer	8 g NaCl 0,2 g KCl 3 g Tris Base H ₂ O _{bidest} ad 1 l
TBS-T	0,05 % Tween 20 in TBS-Puffer
Tris-Puffer für SDS-PAGE	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) und 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
Trypanblau-Lösung (pH 7,4)	0,16 % (w/v) Trypan-Blau 150 mM NaCl
Waschpuffer für Ni-NTA-Aufreinigung (nativ)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8,0 (NaOH)

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde zweifach entsalztes Wasser aus der Millipore-Anlage MilliQ (Millipore, Schwalbach) verwendet.

2.5 Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
DAB Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Diff-Quick Differential Staining Set	Dade Behring, Eschborn
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
ELISA Duo Sets (IL-8 und MIP-2)	R&D Systems, Wiesbaden
Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit	AbD Serotec, Düsseldorf
Mycoplasma Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Nuclear Extract Kit	Active Motif, Rixensart, Belgien
pGEM-T-Easy Vector System	Promega, Mannheim
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
TransAM NFκB Family Kit	Active Motif, Rixensart, Belgien
Vectastain ABC Elite Kit (Rat IgG)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wizard Plus SV Minipreps	Promega, Mannheim
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Mannheim

2.6 Enzyme

DNase I	Promega, Mannheim
iQ SYBR Green Supermix	Biorad, München
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim

2.7 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Die Primer wurden bei der PCR mit einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt, was einer Endkonzentration von 10 pmol/ml entspricht.

Oligonukleotid	Sequenz
18 S-3'	5' CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG 3'
18 S-5'	5' GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT 3'
beta-Actin fw	5' TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT 3'
beta-Actin rev	5' CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC 3'
huHVEM-for	5' GAG GCT GGT GCT GTA TCT 3'
huHVEM-rev	5' GAC TAC ATC ACC CCT TGG 3'
huIL-8-3'	5' TGG AGT ATG TCT TTA TGC ACT GA 3'
huIL-8-5'	5' GCT CTC TTG GCA GCC TTC CT 3'
huLTbR for (285)	5' GCG GTG CCT CCA TAT GCG T 3'
huLTbR rev (515)	5' CAT CAC TGG GTC ACA GGG GC 3'
huLTBR_for	5' AAC GGA TCC GCG CGG TGC CTC CAT ATG C 3'
huLTBR_rev	5' GGC AAG CTT GGT TCC TGA CAT CTC TGG GGG 3'
IkBalpα for neu	5' TTG GAT CCA TGT TTC AGC CAG 3'
IkBalpα rev Xho I	5' GGC TCG AGT TAT AAC GTC AGA CG 3'
pQE for	5' GTA TCA CGA GGC CCT TTC GTC T 3'
pQE rev	5' CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG GAG 3'
SP6-Promotor	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA 3'
T7-Promotor	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

Die Primer für den Nachweis der HVEM-Expression in den humanen Zelllinien wurden von der Firma SABiosciences bezogen.

2.8 Plasmide

pcDNA3.1, Expressionsvektor	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3-hLTβR	eigene Herstellung
pCS3MT-NIK (KK429-430AA)	Arbeitsgruppe von David Wallach
pGEM-T-Easy, Vektor für Zwischenklonierungen	Promega, Mannheim
pGL2-NFκB, Firefly-Luciferase-Reporter-Vektor	Mitchell et al., 1995
phRL-TK, Renilla-Luciferase-Vektor	Promega, Mannheim
pKS (+) Bluescript-IkBα-gl. T7 M9493 S32A/S36A	Arbeitsgruppe von Falk Weih
pQE-32, Expressionsvektor	Qiagen, Hilden

psiRNA-7SKgz-mLTβR
psiRNA-7SKgz-scramble

InvivoGen, San Diego, USA
InvivoGen, San Diego, USA

2.9 Antikörper

Anti-huLTβR, Klon31G4D8 (Maus)	BioLegend, San Diego, USA
Anti-Maus FcγR II/III, Klon 24G2 (Ratte)	eigene Herstellung
Anti-Maus IgG (whole molecule) POX (Ziege)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Maus IgG (γ-chain-specific) AP (Ziege)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Maus Immunglobulins FITC (Kaninchen)	Dako, Hamburg
Anti-Maus LTβR (IgG _{2a}), Klon 5G11b (Ratte)	eigene Herstellung
Anti-Ratte IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (Ziege)	Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe
Anti-RGS His (4) (Maus)	Qiagen, Hilden

2.10 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH10B	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	Qiagen, Hilden

2.11 Zelllinien

Zelllinie (Referenz)	Beschreibung	Kultur
A375 (CRL-1619)	Humane Melanomzelllinie, adhärent	RPMI 1640, 10 % FKS
BFS-1 (Mannel et al., 1979)	Maus-Fibrosarkomzelllinie, methylcholanthreninduziert, adhärent	RPMI 1640, 10 % FKS
Caco-2 (HTB-37)	Humane Kolonkarzinomzelllinie, adhärent	RPMI 1640, 10 % FKS
Caov-3 (HTB-75)	Humane Ovarialkarzinomzelllinie, adhärent	DMEM, 10 % FKS
HCT 116 (CCL-247)	Humane Kolonkarzinomzelllinie, adhärent	RPMI 1640, 10 % FKS
LoVo (CCL-229)	Humane Kolonkarzinomzelllinie, adhärent	RPMI 1640, 10 % FKS
OVCAR-3 (HTB-161)	Humane Ovarialkarzinomzelllinie, adhärent	DMEM, 10 % FKS
OAW42 (Wilson, 1984)	Humane Ovarialkarzinomzelllinie, adhärent	DMEM, 10 % FKS
SK-OV-3 (HTB-77)	Humane Ovarialkarzinomzelllinie, adhärent	DMEM, 10 % FKS
SP2/0-Ag14 (CRL-8287)	Maus-Myelomzelllinie, in Suspension	RPMI 1640, 10 % FKS
SW48 (CCL-231)	Humane Kolonkarzinomzelllinie, adhärent	RPMI 1640, 10 % FKS

SW480 (CCL-228)	Humane Kolonkarzinomzelllinie, adhären	RPMI 1640, 10 % FKS
WiDr (CCL-218)	Humane Kolonkarzinomzelllinie, adhären	RPMI 1640, 10 % FKS

2.12 Versuchstiere

C57BL/6 Wildtyp

Charles River, Sulzfeld

BALB/c Wildtyp

Charles River, Sulzfeld

2.13 Software und Internet-Ressourcen

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Office Word 2007 angefertigt. Die Erstellung der Graphen erfolgte entweder mit Microsoft Office Excel 2007 oder mit GraphPad Prism Version 4.0a. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten fand mit WinMDI 2.8 oder mit BD FACSDiva statt. Das Literaturverzeichnis wurde mit dem Programm Reference Manager 10 erstellt. Statistische Analysen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4.0a durchgeführt. Außerdem fanden folgende Internet-Ressourcen Verwendung:

Ensembl Genome Browser

<http://www.ensembl.org/index.html>

Pubmed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>

2.14 Sonstiges

rhuLIGHT (S2-exprimiert)

eigene Herstellung

huLT β R-Ig (S2-exprimiert)

eigene Herstellung

Mausserum

eigene Herstellung

mLT β R-Ig (S2-exprimiert)

eigene Herstellung

Ratten-IgG

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Bakterienkultur

Für alle Klonierungsschritte wurden Bakterien des Stammes *E. coli* DH10B verwendet. Die Anzucht der Bakterien erfolgte auf LB-Agarplatten im Brutschrank oder in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 220 rpm und 37°C. Zur Selektion der transformierten Bakterien wurden die Nährmedien mit Ampicillin in einer Konzentration von 200 µg/ml versetzt. Bei der Kultur der *E. coli* M15, die für die Expression der extrazellulären Domäne (EZD) des LTβR verwendet wurden, musste zur Selektion zusätzlich zum Ampicillin (200 µg/ml) auch Kanamycin (25 µg/ml) zugegeben werden.

3.1.2 Einfrieren von Bakterienkulturen

Eine logarithmisch wachsende *E. coli*-Kultur wurde im Verhältnis 1:2 mit 87 % Glycerin versetzt und bei –80°C eingefroren.

3.1.3 Transformation

Für die Transformation wurden chemisch kompetente Bakterien (*E. coli* DH10B oder M15) langsam auf Eis aufgetaut und bis zu 10 µl des Ligationsansatzes zugegeben. Diese Mischung wurde 20 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme des Plasmids erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C für 60 s. Anschließend wurden die Zellen 15 min auf Eis gestellt und danach 800 µl LB-Medium ohne Antibiotika hinzugefügt. Nach einstündigem Schütteln bei 37°C wurden die Bakterien kurz abzentrifugiert und in 100 µl des Überstandes durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Diese Suspension wurde dann auf vorgewärmte LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.4 Arbeiten mit DNA

3.1.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte entweder mit dem Wizard Plus SV Miniprep-Kit oder mit dem PureYield Plasmid Midiprep-Kit (beide Promega). Dabei wurde entsprechend den Protokollen des Herstellers vorgegangen. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in nukleasefreiem Wasser gelöst und bei –20°C gelagert.

3.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hierbei kamen für jedes gewünschte PCR-Produkt spezifische Primer zum Einsatz. Die Oligonukleotide, die für die Amplifikation von Klonierungsfragmenten benötigt wurden, waren zumeist mit terminalen Sequenzen für Restriktionsendonukleasen versehen. Die Reaktion fand in einem Volumen von 50 µl statt.

Folgender Reaktionsansatz wurde jeweils pipettiert:

DNA	1-5 µl
10x Puffer	5 µl
5'-Primer (10 µM)	1 µl
3'-Primer (10 µM)	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Taq-DNA-Polymerase	1 µl
Nukleasefreies Wasser	ad 50 µl

Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C wurden im Normalfall 35 Zyklen des folgenden Reaktionsschemas durchlaufen:

DNA-Denaturierung	95°C, 1 min
Primerannealing	Temperatur je nach Primer, 1 min
Elongation	72°C, 30 s bis 1 min

Als Abschluss der PCR-Reaktion erfolgte ein Elongationsschritt für 7 min bei 72°C. Die so gewonnenen DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.1.4.3 Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente im elektrischen Feld voneinander getrennt werden, da sie je nach ihrer Größe unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten aufweisen.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in Agarosegelen mit einer Konzentration von 0,8-1 % (w/v). Die Agarose wurde dafür in 1x TAE-Puffer aufgekocht und in die Gelapparatur gegossen. Nach Polymerisierung wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer in der Laufkammer überschichtet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Abschätzung der Größe der Fragmente wurde zusätzlich ein entsprechender Längenstandard (100 bp oder 1 kb DNA-Ladder, NEB) verwendet. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer elektrischen Spannung

von 5-10 V/cm. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Gel) in das noch flüssige Agarosemedium konnten die DNA-Banden nach dem Gellauf unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Für die analytische Elektrophorese wurden die Gele mit dem Dokumentationssystem GeneGenius (Syngene) fotografiert. Zur weiteren Verwendung der Proben wurden die gewünschten DNA-Banden auf dem UV-Schirm mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und in ein Eppendorfcup überführt.

3.1.4.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die ausgeschnittenen DNA-Fragmente wurden mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System der Firma Promega entsprechend dem Benutzerhandbuch aufgereinigt und mit 20-50 µl nukleasefreiem H₂O eluiert.

3.1.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation von PCR-Produkten setzte sich der Ansatz nach folgendem Pipettierschema zusammen:

aus Gel gereinigtes PCR-Produkt	1-3 µl
2x Ligationspuffer für T4 DNA-Ligase	5 µl
pGEM-T-Easy Vektor (50 ng)	1 µl
T4 DNA-Ligase (3 Weiss units/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Alle anderen Ligationen wurden nach folgendem Ansatz bei einem Gesamtvolumen von 20 µl und einem Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 durchgeführt:

Vektor	x µl
Insert	x µl
10x Ligationspuffer für T4 DNA-Ligase	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Die Ligationsansätze wurde entweder bei RT für 1 h oder bei 4°C über Nacht inkubiert.

3.1.4.6 Restriktionsverdau von DNA

Zur Überprüfung von Konstrukten wurden Kontrollverdaue mit einem Reaktionsvolumen von 10 µl, zur Gewinnung von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurden präparative Verdaue

mit einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Dabei richtete sich die Menge an zugegebenem Puffer und Enzym nach den Angaben des Herstellers.

3.1.4.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der hergestellten DNA-Vektoren wurde bei der Firma Geneart in Regensburg durchgeführt. Hierzu wurden 300 ng Plasmid mit 1 pmol Sequenzierprimer vermischt und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht.

3.1.4.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA- und der RNA-Konzentration erfolgte mittels eines Photometers (Eppendorf). Dabei wurden die Nukleinsäuren in einem Verhältnis von 1:50 bis 1:100 verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen.

3.1.5 Arbeiten mit RNA

3.1.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen wurde ein Pellet von ca. 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen in 1 ml TRIzol resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Gemisch kräftig geschüttelt und anschließend 3 min bei RT stehen gelassen. Nach zweimaliger Wiederholung erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 12000 g und 4°C für 15 min. Die entstandene obere klare Phase wurde in ein neues Eppendorfcup überführt und mit 500 µl Isopropanol vermischt. Nach einem zehnmütigen Inkubationsschritt bei RT und einer anschließenden Zentrifugation bei 12000 g und 4°C für 10 min wurde der Überstand abpipettiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70 % Ethanol versetzt (Verdünnung hergestellt mit nukleasefreiem Wasser) und für 5 min bei 7500 g und 4°C zentrifugiert. Nach der Lufttrocknung wurde die RNA in 50 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

3.1.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Tumorgewebe

Das Tumorgewebe wurde sofort nach Erhalt oder nach einer zweistündigen Stimulation (siehe 3.2.8) bis zur weiteren Verwendung in 500 µl RNeasy lysis reagent gegeben und bei -80°C gelagert.

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde die RNeasy lysis reagent-Lösung wieder entfernt, das Gewebe mit nukleasefreiem Wasser gewaschen und 500 µl TRIzol hinzugefügt. Um eine relativ homogene Suspension zu erhalten, wurde das Tumorgewebe mit einem Mikropistill zerkleinert und durch Auf- und Abziehen der Lösung mit einer Spritze noch besser

resuspendiert. Anschließend wurde erneut 500 µl TRIzol zum zerkleinerten Gewebe hinzupipettiert und 7 min bei RT stehen gelassen. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform, welches durch zehnfaches Invertieren mit dem TRIzol vermischt wurde. Nach weiteren 10 min bei RT wurde die Suspension bei 13400 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Dabei entstanden zwei Phasen. Die obere wurde in ein frisches Eppendorf-Cup überführt, im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem Isopropanol vermischt (ebenfalls durch Invertieren) und bei -20°C für mindestens 30 min inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt von 15 min bei 13400 g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet mit 500 µl eiskaltem 70 % Ethanol (96 % Ethanol verdünnt mit nukleasefreiem Wasser) gewaschen. Schließlich erfolgte eine kurze Lufttrocknung der gewonnen RNA, welche in 50-100 µl nukleasefreiem Wasser gelöst wurde. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.1.5.3 Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) verwendet. Sie synthetisiert DNA-Kopien eines RNA-Moleküls (complementary DNA oder cDNA). Für die reverse Transkription wurde 1 µg der isolierten Gesamt-RNA aus Zellen (siehe 3.1.5.1) oder Tumorgewebe (siehe 3.1.5.2) mit 1 µg OligodT-Primer versetzt und auf 14 µl mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Um Sekundärstrukturen des RNA-Templates aufzulösen, wurde der Ansatz für 5 min bei 70°C erhitzt und anschließend wieder auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl M-MLV 5x Reaction Buffer, 5 µl 10 mM dNTPs und 1 µl M-MLV RT (200 units). Da OligodT-Primer Verwendung fanden, wurde die Reaktionsmischung für 60 min bei 42°C inkubiert. Schließlich wurde der Ansatz für 5 min auf 95°C erhitzt, wieder abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Soweit nicht anders angegeben, wurden für eine Standard-PCR 2 µl der hergestellten cDNA eingesetzt.

3.1.5.4 Quantitative PCR (qPCR)

Mit der sogenannten real time PCR kann man die Akkumulation amplifizierter Produkte bereits während des Reaktionsprozesses, also in der „realen Zeit“, verfolgen. Wird dabei auch die Menge der anfänglich vorhandenen DNA-Kopien eines Zielgens bestimmt, spricht man speziell von der quantitativen PCR. Die Detektion des PCR-Produkts während der Amplifikation ist durch die Zugabe eines fluoreszierenden Moleküls, wie z.B. SYBR Green, möglich. Dies ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet

und durch Anregung bei 498 nm Licht der Wellenlänge 522 nm emittiert. Dabei ist das Fluoreszenzsignal, das man bei jedem Reaktionszyklus erhält, proportional zur Menge an vorhandener DNA, d.h. je stärker das Fluoreszenzsignal ist, desto mehr PCR-Produkt ist in der Reaktion amplifiziert worden.

Die quantitative PCR von IL-8 im humanen Tumorgewebe wurde mittels eines iCyclers von Biorad durchgeführt. Dabei fand der iQ SYBR Green Supermix (ebenfalls von Biorad) Verwendung, der bereits Puffer, DNA-Polymerase, dNTPs und den SYBR Green-Farbstoff beinhaltet.

Für die qPCR wurde pro Probe folgender Ansatz pipettiert:

cDNA (= 40ng)	5 µl
5'-Primer	1 µl
3'-Primer	1 µl
iQ SYBR Green Supermix	12,5 µl
Wasser	5,5 µl

Der PCR-Cycler wurde folgendermaßen programmiert:

3 min	95°C
10 s	95°C
30 s	60°C
1 min	95°C

Am Ende der Reaktion wurde eine Schmelzkurve von 55-95°C mit einer Erhöhung von 0,5°C pro 30 s aufgenommen. Dadurch kann man feststellen, ob bei der PCR-Reaktion tatsächlich nur ein Produkt amplifiziert wurde.

Im Anschluss an die PCR wird in einem sogenannten Amplifikationsplot die Anzahl der Zyklen auf der x-Achse gegen die Fluoreszenzintensität auf der y-Achse aufgetragen. Dann wird aus der Hintergrundfluoreszenz ein Schwellenwert für die Fluoreszenz der Proben berechnet. Der Zyklus, bei dem zum ersten Mal genug amplifiziertes Produkt vorhanden ist, um ein Fluoreszenzsignal zu erhalten, das über dem Schwellenwert liegt, wird als *threshold cycle* oder C_T bezeichnet. Damit können die im Ausgangsmaterial vorhandenen cDNA-Mengen in den verschiedenen Proben verglichen werden. Ist der C_T -Wert klein, dann sind nur wenige Zyklen notwendig, um den Schwellenwert zu überschreiten. Somit war eine größere Menge der Ziel-cDNA in der Probe vorhanden. Bei großen C_T -Werten ist die Anzahl der gesuchten cDNA-Kopien hingegen gering. Um sicherzustellen, dass bei allen Proben eine gleiche Ausgangsmenge an cDNA vorhanden ist, werden die Daten zusätzlich auf ein

Referenzgen normalisiert, welches nicht reguliert ist. In der vorliegenden Arbeit war das die ribosomale 18S-RNA. Außerdem legt man innerhalb der getesteten Proben einen Kalibrator fest, der als 1 definiert wird und in dieser Arbeit unbehandeltes Tumorgewebe darstellt. Die Expression des Zielgens wird schließlich als Zu- oder Abnahme relativ zum Kalibrator angegeben. Bei allen Proben wurden Triplikate analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach der Berechnungsmethode von Pfaffl (Pfaffl, 2001).

3.1.6 Arbeiten mit Proteinen

3.1.6.1 Expression der extrazellulären Domäne (EZD) des huLTβR in *E. coli*

Zur Expression des huLTβR in *E. coli* wurde die EZD des huLTβR im pQE-32-Vektor in M15-Zellen transformiert. Diese besonderen Bakterien tragen ein zusätzliches Plasmid (pREP-4) mit einer Kanamycinresistenz, das den lacI-Repressor konstitutiv exprimiert, so dass eine „leaky“-Expression der Proteine verhindert wird. Erst durch die Zugabe von IPTG wird diese Blockade aufgehoben.

Mit einer 3 ml Vorkultur wurde zunächst 100 ml LB_{Amp/Kan}-Medium angeimpft und die Bakterien bis zu einer OD von ca. 0,6 bei 37°C angezogen. Danach wurde eine Probe entnommen (100 µl), die als nicht induzierte Kontrolle diente. Der Ansatz wurde dann geteilt: die eine Hälfte wurde durch Zugabe von IPTG bis zur Endkonzentration von 1 mM induziert, die andere Hälfte blieb ohne IPTG. Nach der Inkubation bei 37°C für 5 h erfolgte die Entnahme von jeweils 100 µl der Bakteriensuspension, welche anschließend abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl 4x Lämmli-Auftragspuffer gelöst wurde. Nach einem fünfminütigen Inkubationsschritt bei 95°C wurden die Proben zur Überprüfung der Expression des Proteins auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

Für die Proteinextraktion wurde ein größerer Ansatz von 500 ml mit einer Vorkultur angeimpft und mit IPTG induziert. Die Inkubation der Bakterien erfolgte hierbei ebenfalls für 5 h bei 37°C. Im Anschluss daran wurde die Suspension 20 min bei 4°C und 4000 g abzentrifugiert. Bis zur Proteinextraktion erfolgte die Lagerung des Bakterienpellets bei -20°C.

3.1.6.2 Proteinextraktion aus *E. coli*

Die Extraktion und anschließende Aufreinigung der EZD des huLTβR aus *E. coli* erfolgte unter nativen Bedingungen. Zunächst wurde das Bakterienpellet (siehe 3.1.6.1) langsam auf Eis aufgetaut und mit 5 ml Lysepuffer pro Gramm Bakterien resuspendiert. Durch Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml), einer 30minütigen Inkubation auf Eis und einem

Ultraschallschritt von 10 x 10 s bei einer Power von 70 % mit einem Sonifier 450 (Branson) wurden die Bakterien lysiert. Um die Viskosität des Lysats zu verringern, erfolgte ein zusätzlicher DNase I-Verdau. Hierbei wurde DNase I bis zu einer Endkonzentration von 5 µg/ml zugegeben und die Suspension für 15 min auf Eis gestellt. Mit einem abschließenden Zentrifugationsschritt (10000 g, 4°C, 30 min) wurden die Zellreste entfernt. Der Überstand fand für die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose Verwendung.

3.1.6.3 Reinigung der EZD des *huLTβR* mittels Ni-NTA-Agarose

Der aus der nativen Lyse der Bakterien erhaltene Extrakt (siehe 3.1.6.2) wurde mit Ni-NTA-Agarose in einem Verhältnis von 1 ml Agarose auf 4 ml Extrakt versetzt und 1 h bei 4°C geschüttelt. Bei diesem Schritt binden die Proteine an die Ni-NTA-Agarose. Anschließend erfolgte die Beladung einer Glassäule (Biorad) mit dem die Ni-NTA-Agarose enthaltenden Lysat. Das Säulenmaterial wurde zweimal mit Waschpuffer (jeweils ungefähr dreifaches Säulenvolumen) gewaschen und der Durchlauf gesammelt. Danach erfolgte die Elution des Proteins mittels Elutionspuffer. Dafür wurde das Säulenmaterial vier- bis sechsmal mit dem einfachen Säulenvolumen versetzt und die Eluate in Eppendorfcups gesammelt. Für die Analyse der Proteinaufreinigung mittels SDS-Page wurde von allen Durchlauf- und Elutionsfraktionen ein Aliquot entnommen, mit 4x Lämmli-Auftragspuffer vermischt und bei 95°C für 5 min aufgekocht. Die Elutionsfraktionen, die das Protein enthielten, wurden für die weitere Verwendung vereinigt und über Nacht bei 4°C gegen 1x PBS dialysiert.

3.1.6.4 Isolierung von nukleären Proteinextrakten aus BFS-1-Zellen

Zur Gewinnung nukleärer Proteinextrakte aus BFS-1-Zellen wurde der Nuclear Extract Kit (Active Motif) verwendet. Dabei erfolgte die Durchführung entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.1.6.5 Messung der Proteinkonzentration

Bei der Messung der Proteinkonzentration wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Die Konzentrationsbestimmung der nukleären Extrakte aus BFS-1-Zellen wurde mittels des Protein-Assays von Biorad durchgeführt, der auf dem Bradford-Test basiert. Für die Messung wurde zunächst ein Volumen eines Färbereagenz-Konzentrats mit vier Volumen entionisiertem Wasser versetzt, um das Färbereagenz zu erhalten. Anschließend erfolgte die Verdünnung der Proteinproben im Verhältnis 1:5 mit Wasser, wovon wiederum 5 µl mit

250 µl Färbereagenz vermischt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Proben in einem Photometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen.

Die Konzentrationsbestimmung anderer Proteine, wie z.B. der gereinigten EZD des LTβR, wurde mit Hilfe des BCA-Proteinassays von Pierce durchgeführt. Dabei wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die Vermessung der Proben erfolgte mit dem Microplate Reader E_{max} (Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 540 nm.

Bei beiden Methoden wurde jeweils eine BSA-Standardkurve mitgeführt.

3.1.6.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt (Laemmli, 1970). In dieser Doktorarbeit wurde das Mini PROTEAN Electrophoresis System der Firma Biorad verwendet. Zunächst erfolgte das Gießen eines 12,5 %igen Trenngels, welches mit Butanol überschichtet wurde. Nach der Polymerisation des Gels wurde die Butanol-Phase entfernt, das Sammelgel (4 %) über das Trenngel gegossen und ein Kamm eingefügt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 4x Lämmli-Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, die Geltaschen mit den entsprechend vorbereiteten Proben und dem Standard beladen und die elektrophoretische Auftrennung bei einer Stromstärke von ca. 35 mA durchgeführt. Nach dem Lauf erfolgte die direkte Färbung des Gels mit Coomassie-Lösung oder das Blotten der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western Blot).

3.1.6.7 Coomassie-Färbung

Zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen oder auf PVDF-Membranen nach einem Western Blot wurde eine Färbung mit Coomassie-Blau durchgeführt. Die Gele oder Membranen wurden dabei für ca. 1 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend über Nacht entfärbt.

3.1.6.8 Western Blot

Zur Detektion der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Western Blot wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert (Towbin et al., 1979). Dazu wurde zunächst ein Stück einer PVDF-Membran in der Größe des Gels kurz in Methanol geschwenkt, anschließend 2 min in Wasser gelegt und für weitere 5 min in 1x Blotpuffer inkubiert. Zwei Whatmanpapierstücke wurden ebenfalls mit 1x Blotpuffer getränkt. Für den Aufbau des Blots

wurde zunächst ein vorbereitetes Stück Whatmanpapier luftblasenfrei auf die Anodenplatte der Blotapparatur gelegt. Anschließend wurde darauf die vorbehandelte PVDF-Membran, dann das ebenfalls in Blotpuffer getränkte SDS-Gel und als Abschluss das zweite Stück Whatmanpapier luftblasenfrei gegeben. Die Apparatur wurde mit der Kathodenplatte geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung für 1 h bei 1,0 mA pro cm².

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C blockiert. Zur Detektion der Proteine auf der Membran wurde diese in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver und dem entsprechend verdünnten Antikörper für eineinhalb Stunden bei RT geschwenkt. Anschließend erfolgten ein Waschschriff (dreimal für 5min mit TBS-T) und die Inkubation der Membran mit einem sekundären Peroxidase (POX)-gekoppelten Antikörper (verdünnt in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver) für 30 min. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschriff erfolgte die Detektion mittels NOWA A und B Lösung. Dabei wurden die Lösungen im Verhältnis 1:1 vermischt und auf die Membran gegeben. Die dadurch hervorgerufene Chemilumineszenzreaktion wurde durch das Auflegen eines Films sichtbar gemacht. Die Dauer der Filmexposition variierte zwischen 30 s und 5 min.

3.1.6.9 Dot Blot

Für den Dot Blot wurde zunächst eine Proteinlösung punktförmig direkt auf eine trockene Nitrozellulosemembran aufgebracht. Nach einem Trocknungsschriff wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T blockiert. Die Durchführung der Detektion der Proteine mit Hilfe von Antikörpern erfolgte wie beim Western Blot.

3.1.7 „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)

Bei einem ELISA wird ein Antigen entweder direkt an eine Mikrotiterplatte gebunden und mittels eines Antikörpers nachgewiesen oder man verwendet das sogenannte „Sandwich-Prinzip“. Dabei wird die Mikrotiterplatte zunächst mit einem „Fang-Antikörper“ beschichtet. Nach einem Blockierungsschriff, der unspezifische Bindungen verhindern soll, wird die antigenhaltige Probenlösung, so z.B. Überstand aus einer Zellkultur, auf die Platte gegeben. Während einer entsprechenden Inkubationszeit soll das Antigen an den „Fang-Antikörper“ binden und kann anschließend mit einem Sekundärantikörper detektiert werden. Dieser ist dabei meist mit einem Enzym gekoppelt, welches entweder Peroxidase (POX) oder alkalische Phosphatase (AP) ist. Bei einem nicht-konjugierten Zweitantikörper wird zur Detektion ein

dritter Antikörper mit einer Enzymmarkierung verwendet. Eine weitere Möglichkeit der Konjugation von Antikörpern ist die Biotinylierung, die entweder mit einem Streptavidin-POX- oder einem Streptavidin-AP-Komplex nachgewiesen werden kann. Zur Detektion der Menge an gebundenem Antigen wird ein geeignetes chromogenes Substrat verwendet, das photometrisch bei 405 nm oder 450 nm vermessen wird.

3.1.7.1 ELISA zur Bestimmung von Immunglobulintitern im Mausserum

Für die Bestimmung der Immunglobulintiter im Mausserum wurde das Antigen (huLTβR-Ig aus Drosophila-S2-Zellen) zunächst mit Beschichtungspuffer auf eine Konzentration von 1 µg/ml gebracht, 100 µl dieser Lösung in jedes Well pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschriff mit TBS-T (dreimal 300 µl pro Well). Danach wurde 200 µl Blockierlösung (1 % BSA in TBS-T) pro Well für 1 h auf die ELISA-Platte gegeben, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Nach einem weiteren Waschschriff (siehe oben) wurden log2-Verdünnungen des Serums der immunisierten Mäuse (ausgehend von 1:100) in 0,1 % BSA-TBST hergestellt und in Triplikaten auf die Platte aufgetragen. Hierbei wurden 100 µl Verdünnungslösung pro Well verwendet und für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen (siehe oben) folgte der Detektionsantikörper anti-Maus-IgG-AP (γ-chain-specific), der spezifisch nur Immunglobuline vom Typ IgG erkennt. Dieser Antikörper wurde 1:30000 in 0,1 % BSA-TBST verdünnt und für 90 min bei RT auf der Mikrotiterplatte belassen (100 µl/Well). Danach wurde erneut dreimal gewaschen (siehe oben) und anschließend jeweils 100 µl Substratlösung (p-Nitrophenyl-Phosphat in AP-Substratpuffer) in jedes Well gegeben. Nach der Entwicklung der Farbreaktion bis zu einer ausreichend starken Gelbfärbung wurde die Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Reader E_{max} (Molecular Devices) vermessen

3.1.7.2 ELISA zur Austestung der Hybridomüberstände

Für den ELISA zur Austestung der Antikörperproduktion der Hybridome wurde im Wesentlichen das Protokoll zur Bestimmung der Immunglobulintiter verwendet (siehe 3.1.7.1). Für die Bindung des Antigens über Nacht bei 4°C wurde eine Konzentration von 2 µg/ml huLTβR-Ig in Beschichtungspuffer gewählt. Anstatt der Serumverdünnungen wurde jeweils 100 µl des Überstandes der zu testenden Hybridome verwendet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Ein weiterer Unterschied war die geringere Verdünnung des Sekundärantikörpers, die bei 1:10000 in 0,1 % BSA-TBST lag. Alle weiteren Arbeitsschritte entsprachen dem Protokoll in 3.1.7.1.

3.1.7.3 ELISA zur Quantifizierung von IL-8 und MIP-2

Für die Quantifizierung der Konzentration der beiden Chemokine IL-8 und MIP-2 in Zellkulturüberständen wurden die entsprechenden ELISA Duo Sets von R&D Systems verwendet. Die Proben wurden unverdünnt oder bis zu einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Dabei erfolgte die Durchführung nach dem Protokoll des Herstellers.

3.1.8 Luciferase Assay

Zur Bestimmung der NFκB-Aktivität wurden Zellen zunächst transfiziert und stimuliert (siehe 3.2.12) und anschließend im Luciferase Assay analysiert. Hierbei wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Vermessung der Zelllysate erfolgte ebenfalls nach Standardprotokoll mit dem Luminometer Glomax von Promega.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkulturbedingungen

Die Durchführung aller zellbiologischen Arbeiten erfolgte unter Verwendung steriler Reagenzien und Arbeitsmaterialien in einer Sterilbank HERAsafe KS (ThermoScientific). Die Zelllinien wurden mit den in 2.11 angegebenen Medien bei einer Temperatur von 37°C, einer CO₂-Konzentration von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % in einem Inkubator (Heraeus) kultiviert. Je nach Verwendungszweck erfolgte die Aussaat der Zellen in Flaschen oder Multiwellplatten. Für die Erhaltungskultur wurden die Zellen je nach Linie zwei- bis dreimal pro Woche im Verhältnis 1:5 bis 1:10 geteilt. Da die meisten der verwendeten Zelllinien adhärent wachsen, mussten die Zellen von den Kulturgefäßen durch eine Behandlung mit Trypsin-EDTA abgelöst und in frischem Medium resuspendiert werden. Um Waschschrte vorzunehmen, wurden die Zellen in sterile Falcon-Röhrchen überführt, bei 300 g für 10 min zentrifugiert und das Pellet anschließend ebenfalls in frischem Medium gelöst.

3.2.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese 10 min bei 300 g pelletiert und in einer Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen/ml in kaltem Einfriermedium (50 % RPMI 1640, 40 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert, in Aliquots von 1 ml in Kryoröhrchen pipettiert und bei

-80°C tiefgefroren. Nach einigen Tagen wurden die so behandelten Zellen in den Stickstofftank überführt.

Um tiefgefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde ein Kryoröhrchen der gewünschten Zelllinie im 37°C-Wasserbad möglichst schnell aufgetaut und die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen mit kaltem Medium pipettiert. Nach einem Waschschrift zur Entfernung des giftigen DMSO wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

3.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Aussaat von Zellen musste zunächst die Anzahl der lebenden Zellen mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt werden. Dazu wurden die meist adhären Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Zumeist wurde eine 1:10 Verdünnung aus Zellsuspension und Trypanblaulösung hergestellt und mithilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zahl an lebenden Zellen, welche nicht durch Trypanblaulösung angefärbt waren, mikroskopisch ermittelt. Hierbei wurden vier große Quadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt, ein Mittelwert gebildet und die Zellkonzentration entsprechend folgender Formel bestimmt:

Mittelwert der Zellzahl in 16 Kleinquadraten x Verdünnungsfaktor = Zellzahl x 10^4 /ml

3.2.4 Mycoplasmentest

Um die Zelllinien und vor allem die in dieser Doktorarbeit hergestellten Hybridome auf Mycoplasmenbefall zu untersuchen, wurde der Mycoplasma Detection Kit (Roche Diagnostics) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.5 Stimulierung von BFS-1-Fibrosarkomzellen

Die BFS-1-Zellen wurden hauptsächlich für zwei verschiedene Experimente ausgesät und stimuliert. Zum einen wurden die Überstände der Zellen nach Stimulation für die MIP-2 Konzentrationsbestimmung im ELISA verwendet und zum anderen wurde aus den Zellen nukleärer Proteinextrakt isoliert, um diesen im NFκB-ELISA einzusetzen.

Zur Bestimmung der MIP-2-Konzentration wurden die Zellen in 24-Well-Platten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml im Triplikat ausgesät und für 24 h im Inkubator belassen. Anschließend wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen mit 10 µg/ml agonistischem (ag.) anti-Maus LTβR monoklonalen Antikörper (mAK) (Klon 5G11b) für 24 h stimuliert. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen mitgeführt. Die

Kulturüberstände wurden abgenommen, kurz für 5 min bei 13000 g zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen, und im MIP-2-ELISA (R&D Systems) eingesetzt.

Für die Gewinnung der nukleären Extrakte wurden die Zellen in 10 cm-Kulturschalen in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml (10 ml pro Schale) ausgesät. Nach einer 24stündigen Wachstumsphase wurde das Medium, das 10 % FKS enthielt, gegen serumfreies ausgetauscht, um die Zellen für 24 h hungern zu lassen. Nach dieser Zeit wurde das Medium erneut gegen serumfreies gewechselt und die Zellen mit 10 µg/ml agonistischem anti-Maus LTβR mAK für 1 h, 2 h, 6 h und 24 h stimuliert oder unbehandelt belassen. Für die Isolierung der nukleären Proteinextrakte wurde der Nuclear Extract Kit (Active Motif) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

3.2.6 Stimulierung von A375-Zellen

Für die Austestung der agonistischen Wirkung der hergestellten Antikörper (siehe 3.3) wurden A375-Zellen in 24-Well-Platten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/Well im Triplikat ausgesät und für 24 h im Inkubator belassen. Anschließend wurden die Antikörper in Konzentrationen von 1, 2, 5 und 10 µg/ml für 2 h ins Medium gegeben. RhuLIGHT und der agonistische anti-huLTβR mAK (Klon 31G4D8) (Biozol) wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml bzw. 5 µg/ml ebenfalls für 2 h eingesetzt.

Zum Test der antagonistischen Wirkung der hergestellten Antikörper (siehe 3.3) wurden die A375-Zellen wie oben beschrieben behandelt. Die Antikörper wurden jedoch zunächst für 2 h zu den Zellen gegeben und anschließend weitere 2 h mit rhuLIGHT oder anti-huLTβR mAK im Verhältnis 1:1, 5:1 oder 10:1 inkubiert.

Bei allen Ansätzen wurde im Anschluss an die Stimulation die IL-8-Konzentration im Überstand mittels eines ELISAs (R&D Systems) bestimmt.

3.2.7 Stimulierung humaner Tumorzelllinien

Die humanen Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten im Triplikat ausgesät und für 24 h im Inkubator anwachsen gelassen. Nach einem Wechsel des Mediums wurden die Zellen für 2 h, 4 h, 8 h oder 24 h mit 10 µg/ml rhuLIGHT oder 5 µg/ml agonistischem anti-huLTβR mAK (31G4D8) stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Kulturüberstände wurden nach den entsprechenden Zeiten abgenommen, kurz für 5 min bei 13000 g zur Entfernung von Zellresten zentrifugiert und mittels ELISA (R&D Systems) die Konzentration an IL-8 bestimmt.

3.2.8 Stimulierung von humanem Tumorgewebe

In der Pathologie des Klinikums der Universität Regensburg werden frische, operativ entfernte humane Tumore im Schnellschnitt untersucht. Dabei bleiben manchmal Reststücke übrig, die für die Versuche in dieser Doktorarbeit Verwendung fanden. Die Beurteilung der Tumore erfolgte durch die Pathologinnen Dr. Frauke Bataille, Dr. Simone Bertz, Katharina Schardt und Dr. Corinna Vogel.

Für die Experimente wurden humane Kolon- und Ovarialkarzinome in kleine Stücke (10-50 mg) geschnitten und gewogen. Anschließend wurden diese Gewebestücke in 96-Well-Platten mit 250 µl Medium gelegt und mit rhuLIGHT (10 µg/ml) oder agonistischem anti-huLTβR Antikörper (5 µg/ml) stimuliert. Als Negativkontrolle diente unstimuliertes Gewebe. Nach 2 h wurde das Medium abgenommen und kurz bei 13000 g für 5 min zentrifugiert. Die Bestimmung der IL-8-Konzentration im Überstand der Tumore erfolgte mittels ELISA (R&D Systems). Um die Werte miteinander vergleichen zu können, wurde die IL-8-Produktion auf 10 mg Tumorgewebe umgerechnet.

3.2.9 MTT-Test

Bei verschiedenen humanen Tumorzelllinien wurde mittels eines MTT-Tests untersucht, ob die Zugabe von rhuLIGHT oder agonistischem anti-Human LTβR mAK zum Absterben der Zellen führt. Der MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in blau-violette Formazankristalle. Dabei zeigt die Bildung des blauen Farbstoffs den Anteil der lebenden Zellen an. Die entsprechenden Zellen wurden in 96-Well-Platten in einer Konzentration von 10000, 5000 und 2500 in Triplikaten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und rhuLIGHT oder 31G4D8 in einer Konzentration von 10 µg/ml bzw. 5 µg/ml hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen unbehandelt belassen. Nach einer 24-stündigen Inkubation erfolgte die Zugabe von 5 µl MTT für 4 h. Anschließend wurden 35 µl 20 % SDS hinzupipettiert und die Zellkulturplatte über Nacht im Inkubator belassen. Die Vermessung des MTT-Tests erfolgte im ELISA-Reader E_{max} (Molecular Devices) bei 540 nm.

3.2.10 Erstellung einer Wachstumskurve von BFS-1-Fibrosarkomzellen

Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurden die Fibrosarkomzellen in 6-Well-Platten in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen pro Well ausgesät. Anschließend wurde vier Tage lang die Anzahl der Zellen/Well in Triplikaten bestimmt.

3.2.11 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen mittels DOTAP

Um eine stabile Transfektion mit Plasmid-DNA durchzuführen, wurden die gewünschten Zellen in 6 cm-Schalen in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ pro Kulturschale ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach einem Wechsel des Mediums wurde die Transfektion mittels DOTAP (Roche Diagnostics) durchgeführt, wobei ein Verhältnis von 1 µg DNA zu 6 µl DOTAP gewählt wurde. Die Transfektionsmischung wurde 5 h auf den Zellen belassen und im Anschluss daran das Medium gewechselt und sofort je nach Zelltyp mit 300 µg/ml bis 1000 µg/ml Selektionsantibiotikum (Neomycin oder Zeocin) versetzt.

3.2.12 Vorbereitung von Zellen für den Luciferase Assay

Für den Luciferase Assay wurden die Zellen (entweder BFS-1 oder A375) in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine transiente Transfektion mittels DOTAP. Dabei wurden 0,1 µg des phRL-TK-Plasmids mit Renilla-Luciferase als Transfektionskontrolle und 1,5 µg des pGL2-NFκB-Vektors mit Firefly-Luciferase als Reporterplasmid in einem Gesamtvolumen von 15 µl HBS-Puffer vermischt. Dieser Ansatz wurde zu einer Mischung von 10 µl DOTAP und 30 µl HBS-Puffer gegeben, ein paar Mal auf- und abpipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte in den 24-Well-Platten ein Mediumwechsel, die Transfektionsmischung wurde dazugegeben und für ca. 18 h auf den Zellen belassen. Danach wurden die Zellen mit den entsprechenden Reagenzien für 2 h (A375) oder 4 h (BFS-1) stimuliert (siehe 3.2.5 und 3.2.6) und schließlich mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) ein Zelllysats hergestellt, das im Luciferase Assay (siehe 3.1.8) analysiert wurde.

3.2.13 Zytozentrifugationspräparate

Für die Herstellung eines Präparats wurden ca. 5×10^4 Zellen (Peritoneal-Exsudat-Zellen, siehe 3.3.3) in 50 µl Medium aufgenommen und mit 50 µl FKS versetzt. Der Zentrifugationsschritt erfolgte bei 700 rpm für 5 min in einer Zytozentrifuge (Shandon

Cytospin 4, ThermoScientific) auf Objektträger. Diese wurden ca. 1 h bei RT getrocknet, anschließend mittels Diff-Quick gefärbt (siehe 3.5.1) und im Mikroskop analysiert.

3.2.14 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Messungen erfolgten auf einem BD LSR II der Firma BD Biosciences und wurden mit den Programmen WinMDI 2.8 oder mit BD FACSDiva ausgewertet. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten FITC oder APC. Alle Schritte, die für die Färbung der Zellen notwendig waren, wurden bei 4°C durchgeführt.

Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden zunächst ca. 1×10^6 Zellen auf FACS-Röhrchen verteilt, bei 300 g für 10 min pelletiert und der Überstand vorsichtig abgekippt. Anschließend erfolgte ein Blockierschritt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermindern. Dabei wurden die Zellen mit 50 µl eines spezifischen Antikörpers gegen die Fcγ-Rezeptoren II und III in FACS-Puffer für 20 min inkubiert. Die Erstantikörper wurden dann in den entsprechenden Konzentrationen in 50 µl FACS-Puffer zu den Zellen pipettiert, so dass sich ein Gesamtvolumen von 100 µl ergab. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurde in die Röhrchen jeweils 4 ml FACS-Puffer gegeben, die Zellen bei 300 g für 10 min pelletiert und der Überstand erneut vorsichtig abgekippt. Im Anschluss daran wurden die Zweitantikörper in den entsprechenden Konzentrationen mit FACS-Puffer verdünnt und 100 µl dieser Lösung auf die Zellen pipettiert. Die zwanzigminütige Inkubation erfolgte im Dunkeln auf Eis, da die Sekundärantikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen schließlich in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer vermessen.

3.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

3.3.1 Immunisierung von Mäusen

Zur Herstellung von Antikörpern gegen den humanen LTβR wurden zwei weibliche Balb/c-Mäuse alle drei Wochen mit 20 µg des aus *E.coli* aufgereinigten rekombinanten Proteins (EZD des huLTβR) immunisiert. Als Adjuvans wurde Titermax Gold Adjuvant (Sigma-Aldrich) verwendet, das im Verhältnis 1:1 mit dem in PBS gelösten Protein zu einer Wasser-Öl-Emulsion vermischt wurde. Diese wurde den Tieren in einem Volumen von jeweils 500 µl intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Ab der dritten Immunisierung wurde das Antigen ohne Adjuvans appliziert. Bei der letzten Immunisierung, die vier Tage vor der Fusion stattfand, wurde den Tieren jeweils eine Dosis von 50 µg des rekombinanten Proteins verabreicht. Zur

Gewinnung von Serum erfolgte eine Woche nach der zweiten und der dritten Antigenapplikation und am Tag der Fusion eine Blutabnahme.

3.3.2 Gewinnung von Serum aus Vollblut

Um für die Bestimmung des Immunglobulintiters Serum zu gewinnen, wurde das aus den Mäusen erhaltene Blut nach der Abnahme 1 h bei RT stehen gelassen und zur vollständigen Gerinnung über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 14000 g und RT. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig vom Blutkuchen abpipettiert. Das so erhaltene Serum wurde bei -20°C gelagert.

3.3.3 Gewinnung von Peritoneal-Exsudat-Zellen (PEC)

Die Peritoneal-Exsudat-Zellen werden zusammen mit den fusionierten Milzzellen kultiviert, um ein konditioniertes Medium zu erzeugen und um nach der Fusion abgestorbene Zellen durch Phagozytose zu beseitigen. Die Isolierung der PECs erfolgte zwei Tage vor der eigentlichen Fusion. Für die Gewinnung von PECs wurde C57BL/6-Mäusen zunächst 1 ml steriles PBS i.p. verabreicht. 12 bis 16 h später wurden die Mäuse dekapitiert und der Bauchraum mit 10 ml kaltem RPMI 1640 (mit 10 % FKS) ausgespült. Nach einem Waschschrift wurden die so erhaltenen Zellen in HAT-Medium resuspendiert, gezählt, mittels Diff-Quick (siehe 3.2.13 und 3.5.1) gefärbt und im Mikroskop analysiert. Im Durchschnitt erhielt man 1 bis 2×10^6 Zellen pro Maus. Die PECs wurden in HAT-Medium auf 96-Well-Platten in einer Konzentration von ca. 2×10^4 Zellen pro Well (Kulturvolumen 100 μ l) ausgesät. Für eine Fusion wurden 15 96-Well-Platten benötigt.

3.3.4 Isolierung von Milzzellen

Am Tag der Fusion wurde den immunisierten Mäusen zunächst Blut abgenommen und die Tiere anschließend mittels Genickzug getötet. Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und mithilfe eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb gedrückt. Im Anschluss daran erfolgte ein zweimaliger Waschschrift der Milzzellsuspension mit kaltem, serumfreiem Medium. Außerdem wurden die Zellen gezählt. Aus einer Milz eines erwachsenen Tieres erhält man ungefähr 1×10^8 Zellen. Für die Fusion wurde jeweils die Hälfte der Milzzellen eingesetzt; die andere Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren (siehe 3.2.2).

3.3.5 Zellfusion mit Polyethylenglykol

Bei der zur Fusion verwendeten Maus-Myelomzelllinie Sp2/0-Ag14 handelt es sich um ein Hybridom aus Balb/c-Milzzellen und der Myelomzelllinie P3X63AAG8, das sich gut mit PEG 1500 fusionieren lässt (Shulman et al., 1978).

Für die Fusion wurden serumfrei gewaschene Milzzellen mit ebenso vorbereiteten Sp2/0-Ag14 Myelomzellen im Verhältnis 3:1 vermischt und bei 300 g und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Danach wurde der gesamte Überstand vollständig abgesaugt und die Zellen im 50 ml Falcon-Röhrchen für 1 min im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Anschließend erfolgte innerhalb von einer Minute unter ständigem Drehen die Zugabe von 1 ml des ebenfalls auf 37°C aufgewärmten PEG 1500. Nach einem erneuten Inkubationsschritt der Zellen für 1 min bei 37°C wurde innerhalb von 5 min unter ständigem Drehen 10 ml warmes Medium mit 10 % FKS hinzupipettiert. Diese Zellsuspension wurde mit HAT-Medium auf insgesamt 150 ml aufgefüllt und auf die drei Tage vorher mit PECs vorbereiteten 15 96-Well-Platten gegeben (100 µl/Well). Dadurch ergab sich in den Wells ein Gesamtvolumen von 200 µl (100 µl der PEC-Kultur und 100 µl der fusionierten Zellen). Eine Reihe der letzten Platte wurde als Absterbekontrolle nur mit Sp2/0-Ag14 Zellen (1×10^4 Zellen pro Well in 100 µl) bestückt. Die Selektion der fusionierten Zellen erfolgte durch das HAT-Medium, in dem nur aus Milzzellen und Sp2/0-Ag14 Zellen entstandene Hybridome überleben können (Foung et al., 1982).

Nach ungefähr sieben bis acht Tagen waren die ersten Klone in den Wells zu sehen. Diese konnten nach ca. 12 Tagen im ELISA auf ihre Antikörperproduktion hin untersucht werden. Nach etwa drei Wochen wurde begonnen, die Kultur zunächst von HAT- auf HT-Medium und schließlich auf normales Medium umzustellen. Außerdem wurde die Kultur der Zellen langsam von den 96-Well-Platten auf größere Gefäße bis hin zur Zellkulturflasche umgestellt.

3.3.6 Subklonierung von Hybridomzellen

Um sicherzustellen, dass die erhaltenen Hybridome monoklonal sind, wurden aus den positiv getesteten Kulturen Zellen entnommen und subkloniert. Dazu wurden in einer 96-Well-Platte (mit PECs) in der linken Reihe zunächst jeweils 100 Zellen pro Well ausgesät. Anschließend erfolgte eine Verdünnung der Zellen in Zweierschritten zur rechten Seite hin. Rein rechnerisch erhält man dadurch ab der achten Verdünnung weniger als eine Zelle pro Well. Diejenigen Hybridome, die ab diesem Well hochwuchsen, wurden im ELISA auf ihre Antikörperproduktion getestet. Wurde bei allen Klonen ein positives Ergebnis festgestellt,

konnte man davon ausgehen, dass auch die Mutterzellen bereits monoklonal waren. Die erhaltenen Subklone wurden weiterkultiviert und gegebenenfalls für die Antikörperproduktion verwendet.

3.3.7 Reinigung monoklonaler Antikörper

Für die Gewinnung gereinigter monoklonaler Antikörper wurden die gewünschten Hybridome bis zu einer relativ großen Dichte in 175 cm²-Zellkulturflaschen in einem Volumen von 50 ml Medium wachsen gelassen. Um Zellreste zu entfernen, wurde der die Antikörper enthaltende Überstand zunächst für 10 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert, anschließend sterilfiltriert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Die eigentliche Antikörperreinigung erfolgte mit Hilfe der Proteinaufreinigungsanlage Econo System (Biorad). Nach der Beladung der Protein G Sepharosesäule (1 ml/min) wurde solange mit PBS gespült, bis die Absorption wieder den Nullwert erreicht hatte. Die Antikörper wurden mit Elutionspuffer bei einer Durchflussrate von 0,5 ml/min wieder von der Säule gewaschen. Direkt nach der Elution erfolgte die Neutralisation der Fraktionen, die anschließend über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert wurden. Nach der Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Assay erfolgte die Lagerung der Aliquots bei -80°C.

3.3.8 Bestimmung des Isotyps von Antikörpern

Zur Bestimmung des Isotyps von Antikörpern wurde der Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit (AbD Serotec) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

3.4 Tierexperimentelle Methoden

3.4.1 Tierhaltung und Versuchstiere

Alle verwendeten Tiere waren entsprechend den Haltungsvorschriften untergebracht, hatten einen 12 h Hell-Dunkel Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser *ad libitum*.

Die für die Tumorversuche benötigten C57BL/6-Mäuse wurden wie die für die Immunisierung verwendeten Balb/c-Mäuse von Charles River (Sulzfeld) bezogen und mindestens zwei Wochen im Tierstall gehalten, bevor sie für die Experimente eingesetzt wurden.

3.4.2 Erzeugung von Fibrosarkomen aus BFS-1-Zellen

Die adhärenen BFS-1-Zellen wurden bis zur Konfluenz in Kulturflaschen angezogen. Um die Zellen für die Injektion in C57BL/6-Mäuse vorzubereiten, wurden sie mit sterilem PBS gespült, mit Trypsin-EDTA behandelt und die sich ablösenden Zellen in frischem Medium resuspendiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt und in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ 50 μ l in sterilem PBS resuspendiert. Diese Mischung wurde in eine 1 ml-Spritze aufgezogen und bis zur Injektion auf Eis belassen. Um eine Verklumpung der Zellen zu verhindern, musste die Spritze mehrfach geschwenkt werden. Anschließend erfolgte die Narkotisierung der Mäuse. Den Tieren wurde dabei eine Mischung aus 15 % Ketamin und 8 % Xylazin in PBS (10 μ l pro g Maus) i.p. verabreicht. Nach Feststellung der vollständigen Anästhesie mittels Drucktest an der Hinterpfote wurde den Mäusen der Rücken rasiert und 50 μ l der Zellsuspension ($1,5 \times 10^6$ Zellen/Maus) subkutan injiziert.

3.4.3 Messung des BFS-1-Tumorwachstums

Ungefähr drei bis fünf Tage nach der Injektion der BFS-1-Zellen war ein Tumor auf dem Rücken der Mäuse zu erkennen. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Tumorwachstum alle zwei bis drei Tage mit einer Schieblehre vermessen. Dabei wurde sowohl die Länge als auch die Breite des Tumors festgehalten. Die Messung erfolgte, bis die Tumore maximal einen Durchmesser von 1,5 cm erreicht hatten.

3.4.4 Entnahme von BFS-1-Fibrosarkomen

Zur Entnahme der Tumore wurden die Tiere zunächst mittels Genickzug getötet. Anschließend erfolgte die Präparation der Tumore. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Tumore in Falcon-Röhrchen gegeben und auf Eis gelagert.

3.4.5 Bestimmung der MIP-2-Expression von Fibrosarkomen *ex vivo*

Für die Bestimmung der MIP-2-Expression von Fibrosarkomen aus BFS-1-Zellen wurden die Tumore zunächst unter sterilen Bedingungen in kleinere Stücke (50-100 mg) geschnitten und mittels einer Feinwaage gewogen. Die Stücke wurden anschließend in 48-Well-Platten mit 500 μ l Medium gelegt. Nach vier Stunden wurde das Medium abgenommen, zur Beseitigung von Zellresten kurz abzentrifugiert und im ELISA die MIP-2-Konzentration bestimmt. Um

die Werte miteinander vergleichen zu können, erfolgte die Umrechnung auf 10 mg Tumorgewebe.

3.5 Immunhistologische Methoden

3.5.1 Diff-Quick-Färbung von PECs

Für die Diff-Quick-Färbung von PECs wurden die luftgetrockneten Zytozentrifugationspräparate (siehe 3.2.13) durch Eintauchen der Objektträger in die Fixierlösung (6x), in die Färbelösung 1 (8x) und 2 (10x) und anschließendes Waschen in entionisiertem H₂O für 5 min gefärbt. Nach einem Trocknungsschritt wurde direkt auf die Präparate Immersionsöl gegeben. Die Analyse der Zusammensetzung der PECs erfolgte schließlich mit Hilfe eines Durchlicht-Mikroskops.

3.5.2 Färbung humaner Gewebe

Die Färbung des LT β R wurde auf humanen Milzschnitten und auf humanen Kolon- und Ovarialkarzinomschnitten durchgeführt. Dabei wurde von dem bereits in Paraffin eingebetteten Material, das von der Pathologie des Klinikums der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt wurde, am Mikrotom 3 μ m dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden für 30 min bei 72°C inkubiert, um das Paraffin abzuschmelzen, und anschließend für ca. 10 min in Xylol entparaffiniert. Nach einer Behandlung der Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe erfolgte ein 30minütiger Inkubationsschritt in 0,3 % H₂O₂ bei RT, um die endogene Peroxidaseaktivität abzufangen. Im Anschluss an einen Waschschrift mit PBS für 5 min wurde die Färbung mit Hilfe des Vectastain ABC Elite Kits (Rat IgG) (Vector Laboratories) in einer feuchten Kammer durchgeführt, wobei von den Antikörper- und Serumverdünnungen jeweils 100 μ l auf die Schnitte pipettiert wurden. Zunächst erfolgte für 30 min ein Blockierungsschritt mit Kaninchenserum aus dem Kit. Danach wurde das Serum entfernt und der Schnitt mit unverdünntem Überstand des Hybridoms 3G10H3 (anti-huLT β R Antikörper) oder als Isotypkontrolle mit Ratten-IgG (1:100 mit PBS verdünnt) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (ebenfalls aus dem Kit) für 30 min. Schließlich wurden die Schnitte nochmals mit PBS für 5 min gewaschen und 30 min mit dem Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Laboratories) behandelt. Danach erfolgte die Färbung der Präparate mit dem DAB Substrate Kit (Vector Laboratories) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Schnitte wurden für 5-10 min mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Hämalaun gegengefärbt, in

einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Entellan eingedeckelt. Die Betrachtung und Dokumentation der Präparate erfolgte mittels eines Mikroskops mit angeschlossener Kamera (Olympus).

3.6 Statistik

Die Ergebnisse aus ELISA-Auswertungen und aus Tierexperimenten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) angegeben. Statistische Analysen wurden unter Verwendung des Mann-Whitney-Rank-Sum-Tests mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4.0a durchgeführt. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Die Rolle der LT β R-Aktivierung bei Angiogenese und Tumorwachstum in der Maus

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass das Wachstum von Tumoren, die durch die Injektion von BFS-1-Fibrosarkomzellen in C57BL/6-Mäuse entstehen, von der Aktivierung des LT β R auf den Fibrosarkomzellen abhängig ist (siehe 4.1.1). Um einen näheren Einblick in die zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten, sollte zunächst die Expression des LT β R auf den Fibrosarkomzellen mittels shRNA herunter reguliert und die daraus resultierenden Auswirkungen auf das Tumorwachstum *in vivo* aufgeklärt werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Aktivierung beider NF κ B-Signalwege nach Stimulation des LT β R auf den BFS-1-Zellen *in vitro* und den daraus resultierenden Einfluss auf das Tumorwachstum *in vivo* zu untersuchen.

4.1.1 Das LT β R-abhängige BFS-1-Tumormodell

Wie bereits erwähnt ist im BFS-1-Tumormodell das Wachstum der Tumore abhängig von der Aktivierung des LT β R auf den Fibrosarkomzellen. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass LT β R-Ig produzierende Fibrosarkomzellen langsamer auf syngen C57BL/6-Mäusen wachsen als Kontrollzellen. Außerdem ist das Tumorwachstum auf Tieren, die defizient für einen Liganden des LT β R (LT α / β ^{-/-}) sind, ebenfalls verlangsamt. Desweiteren zeigte sich, dass durch die Aktivierung des LT β R auf den BFS-1-Fibrosarkomzellen eine erhöhte Produktion des proangiogenen MIP-2 induziert wird. Dadurch kommt es auch zu einer gesteigerten Bildung von Blutgefäßen im Tumor. Somit führt die Verhinderung der Stimulation des LT β R durch LT α ₁ β ₂, das auf eingewanderten aktivierten Lymphozyten exprimiert wird, zu einer verringerten Angiogenese und zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums (Hehlhans et al., 2002).

4.1.2 Herunterregulation der Expression des LT β R in BFS-1-Fibrosarkomzellen mittels short hairpin RNA (shRNA)

Vor einigen Jahren wurde der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) entdeckt, bei dem es zu einem sequenzspezifischen „gene silencing“ durch post-transkriptionale Prozesse kommt (Fire et al., 1998). RNAi kann auf verschiedene Arten in eukaryotischen Zellen ausgelöst werden. Eine Möglichkeit ist die Verwendung synthetisch hergestellter siRNAs

(small interfering RNA), die eine Länge von 21- 23 bp haben und mit denen die Herunterregulation der Expression der Zielgene transient erfolgt (Elbashir et al., 2001). Eine weitere Möglichkeit des Knock-downs von Genen ist die stabile Transfektion mit Plasmiden, die sogenannte short hairpin RNAs (shRNA) exprimieren. Hierbei werden die Templates der gewünschten siRNAs vor RNA-Promotoren kloniert, die von der RNA-Polymerase III transkribiert werden (Brummelkamp et al., 2002). Da die shRNAs an einem Ende einen „hairpin“ bilden, muss dieser in der Zelle zunächst von einem Multienzymkomplex namens Dicer in aktive siRNAs gespalten werden. Im Anschluss daran erfolgt die Eingliederung der entstandenen siRNA-Duplexe in den *RNA-induced silencing complex* (RISC), einem Endonukleasekomplex, in dem eine Helicase dazu führt, dass die Duplexe „abgerollt“ werden. Der Gegenstrang eines Duplex leitet den aktiven RISC schließlich zur komplementären mRNA, die von einer Nuklease im RISC gespalten und sehr schnell abgebaut wird, wodurch die Produktion des entsprechenden Proteins verhindert werden kann (Takeshita et al., 2006). In dieser Arbeit wurde versucht, die Expression des LT β R in den Fibrosarkomzellen mit Hilfe eines shRNA-Plasmids stabil herunter zu regulieren. Der Nachweis des Knock-down erfolgte mittels einer FACS-Analyse. Außerdem wurden in den stabilen Transfektanten die MIP-2-Expression und die NF κ B-Aktivierung untersucht.

4.1.2.1 Das shRNA-Plasmid

Für die Herunterregulation der Expression des LT β R auf den BFS-1-Fibrosarkomzellen wurden die Plasmide psiRNA-7SKgz-mLT β R (siehe Abb. 5) und als Negativkontrolle psiRNA-h7SKgz-Scramble der Firma InvivoGen verwendet, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Kebin Liu zur Verfügung gestellt wurden (Yang et al., 2007). Bei dem Vektor ist das Template für die shRNA vor einen 7SK-Promotor kloniert, der von der RNA-Polymerase III transkribiert werden kann. Außerdem ist ein CMV-HTLV-Promotor vorhanden, der für eine hohe konstitutive Expression in eukaryotischen Zellen sorgt. Als Selektionsmarker dient das Antibiotikum Zeocin, das in diesem Vektor mit GFP fusioniert ist. Dadurch kann die Transfektionseffizienz bestimmt und Zellklone, die die shRNA stabil exprimieren, isoliert werden.

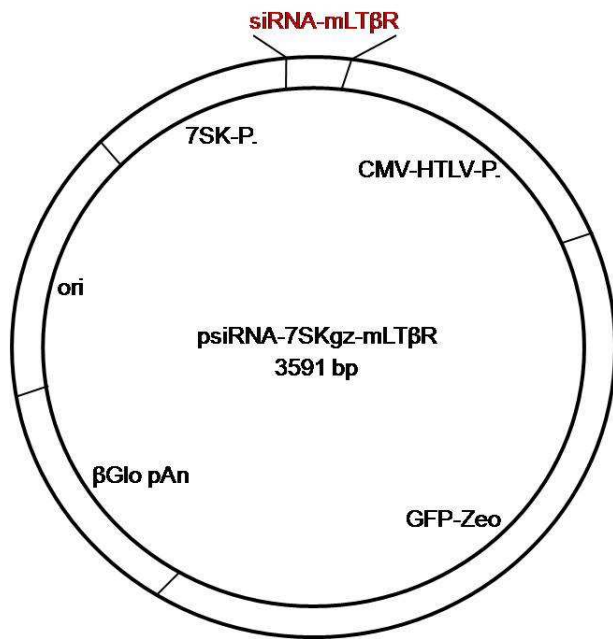


Abb. 5 Das psiRNA-7SKgz-mLTβR-Plasmid. 7SK prom= Promotor für RNA-Polymerase III, CMV-HTLV prom= CMV-HTLV-Promotor, GFP-Zeo= GFP-Zeocin-Fusionsgen, βGlo pAn= humane beta-globin 3'UTR- und Polyadenylierungs-Sequenz, ori= origin of replication.

Folgende Sequenz des siRNA-Templates wurde zum Knock-down des LTβR verwendet: 5' GGC ACA GAA GCC GAG GTC ACA 3'. Im kodierenden Bereich des LTβR repräsentiert diese Sequenz den Abschnitt zwischen den Basen 457 und 477. Als Negativkontrolle diente ein siRNA-Template, das das Zielgen nicht beeinflusst (5'ATA GCG ACT AAA CAC ATC AA 3'), und hier als „Scramble“ bezeichnet wird.

4.1.2.2 FACS-Analyse des Knock-downs der LTβR-Expression in den shRNA-Transfektanten

BFS-1-Fibrosarkomzellen wurden jeweils mit beiden shRNA-Plasmiden transfiziert und mit Zeocin in einer Konzentration von 300 µg/ml selektiert. Danach wurden die Transfektionseffizienz und der Grad der Herunterregulation der Expression des LTβR mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt (siehe Abb. 6).

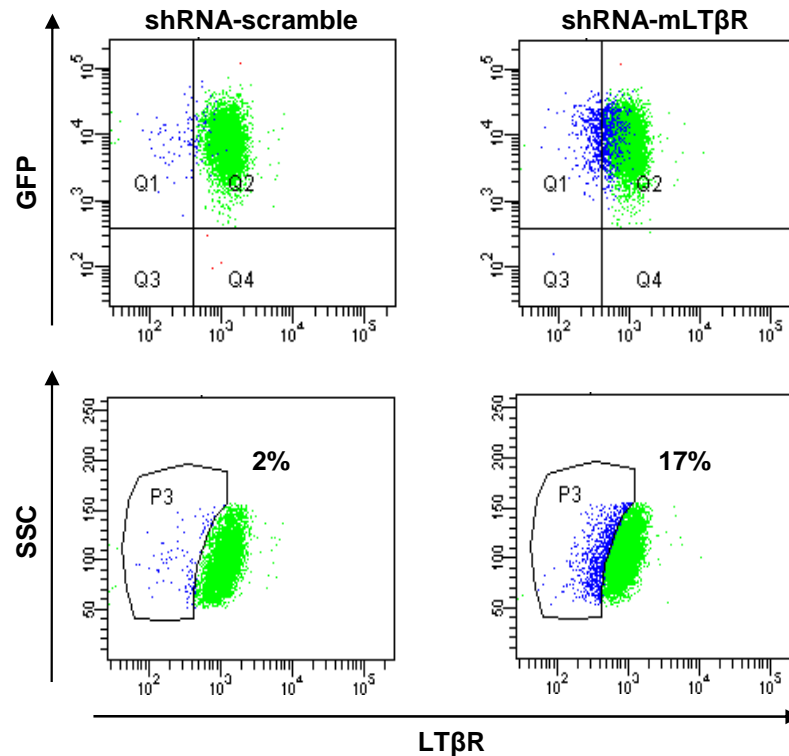


Abb. 6 FACS-Analyse der shRNA-Transfektanten. Die Transfektanten wurden mit anti-mLT β R AK gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Zellen, bei denen ein Shift auf der GFP-Achse zu sehen ist, sind transfiziert (obere Reihe). In der unteren Reihe ist die Herunterregulation des LT β R in den shRNA-mLT β R-Transfektanten dargestellt.

Die Transfektionseffizienz, die man an der GFP-Expression erkennen kann, liegt sowohl bei den Kontrollzellen (shRNA-scramble) als auch bei den shRNA-mLT β R-Transfektanten bei annähernd 100 % (siehe Abb. 6, obere Reihe). Die Expression des LT β R ist in 15 % der shRNA-mLT β R-Transfektanten herunter reguliert (siehe Abb. 6, untere Reihe, P3).

4.1.2.3 MIP-2-Expression der shRNA-Transfektanten

Die Expression des proangiogenen Chemokins MIP-2 wird in den Fibrosarkomzellen durch die spezifische Stimulation des LT β R mit einem agonistischen anti-Maus LT β R mAK erhöht (Hehlgans et al., 2002). Da die shRNA-mLT β R-Transfektanten eine geringere Expression des LT β R auf der Oberfläche aufweisen, stellte sich die Frage, ob dies einen Einfluss auf die MIP-2-Expression haben könnte. Für die Untersuchung wurden sowohl die shRNA-mLT β R-Transfektanten als auch die Kontrollzellen (shRNA-scramble) in 24-Well-Platten ausgesät und für 24 h mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus LT β R mAK (Klon 5G11b) stimuliert. Nach weiteren 24 h erfolgte die Bestimmung der MIP-2-Konzentration im Überstand (siehe Abb. 7).

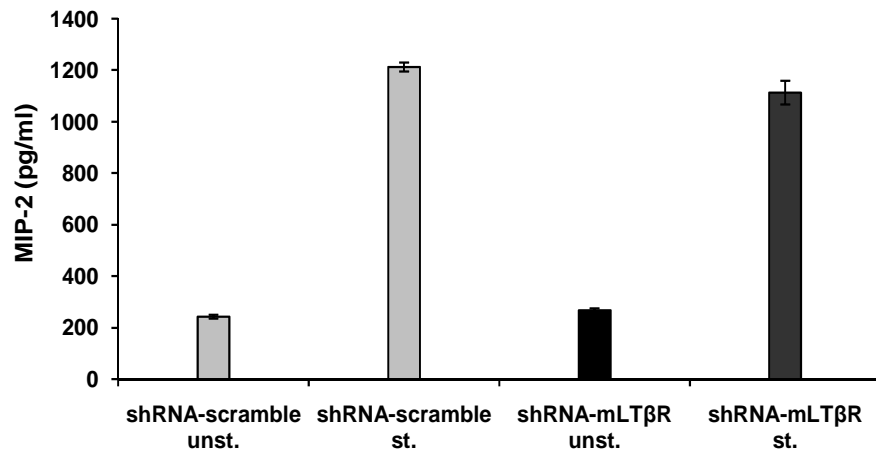


Abb. 7 MIP-2-Expression der shRNA-Transfektanten. Die Zellen wurden in 24-Well-Platten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in Triplikaten ausgesät und nach einem Tag mit $10 \mu\text{g/ml}$ agonistischem anti-mLTβR mAK (5G11b) für weitere 24 h stimuliert. Die MIP-2-Konzentration im Kulturüberstand wurde mittels eines ELISAs ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. unst.= unstimuliert, st.= stimuliert. Gezeigt ist eines von zwei übereinstimmenden Experimenten.

Im unstimulierten Zustand ergeben sich bei beiden Transfektanten keine Unterschiede in der MIP-2-Expression. Nach der spezifischen Stimulation des LTβR exprimieren die shRNA-mLTβR-Zellen leicht reduzierte Mengen an MIP-2 als die Kontrollzellen. Die Herunterregulation der LTβR-Expression um 15 % reicht somit nicht aus, um einen deutlichen Effekt bei der induzierten MIP-2-Expression zu erreichen.

4.1.2.4 NFκB-Aktivierung in shRNA-Transfektanten

Durch die Stimulation des LTβR kommt es zur Aktivierung beider NFκB-Signalwege (Hehlgans et al., 2005). Um zu untersuchen, ob bereits durch die geringe Herunterregulation der Expression des LTβR in den shRNA-mLTβR-Transfektanten um 15 % eine Abnahme bei der induzierten NFκB-Aktivität zu erzielen ist, wurde ein NFκB-abhängiger Reporterassay durchgeführt (siehe 3.2.12).

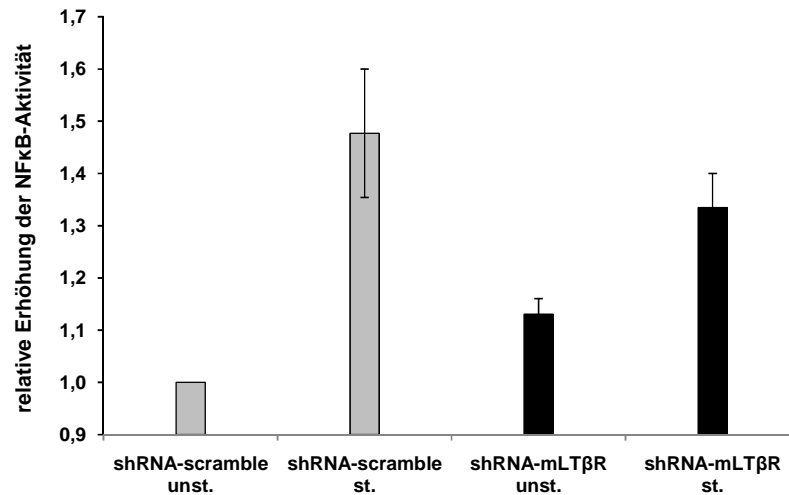


Abb. 8 NFκB-Aktivität der shRNA-Transfektanten. Mit den shRNA-scramble- und shRNA-mLTβR-BFS-1-Zellen, die transient mit NFκB-Plasmiden (phRL-TK und pGL2-NFκB im Verhältnis 1:15) transfiziert waren, wurde nach vierstündiger Stimulation mit 10 µg/ml agonistischem anti-Maus LTβR mAK ein NFκB-abhängiger Reporterassay durchgeführt. Die Normalisierung der Firefly-Luciferase erfolgte anhand der Renilla-Luciferase (Transfektionskontrolle). Anschließend wurde der Wert der unstimulierten shRNA-scramble-Transfektanten gleich eins gesetzt und die anderen Ergebnisse darauf bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. unst.= unstimuliert, st.= stimuliert.

Der Luciferase Assay ergab, dass bei den shRNA-scramble-BFS-1-Zellen die NFκB-Aktivität wie erwartet durch die Stimulation des LTβR mit einem agonistischen Antikörper erhöht ist. Durch die Herunterregulation der Expression des LTβR in den shRNA-mLTβR-Transfektanten ist eine leichte Abnahme der NFκB-Aktivität zu erkennen (siehe Abb. 8).

Da wie bei der MIP-2-Expression auch keine signifikante Reduktion der NFκB-Aktivität bei den shRNA-mLTβR-Transfektanten nachweisbar war, wurde von weiterführenden *in vivo*-Versuchen abgesehen.

4.1.3 NFκB-Aktivierung in BFS-1-Fibrosarkomzellen

Die Erhöhung der NFκB-Aktivität nach der Stimulierung des LTβR konnte bereits gezeigt werden (siehe Abb. 8 und Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch noch nicht bekannt, welcher der beiden NFκB-Signalwege, der klassische oder der alternative (siehe 1.2), nach der Stimulierung des LTβR aktiviert wird. Dafür wurden die Fibrosarkomzellen in 10 cm-Schalen ausgesät, unterschiedlich lange mit 10 µg/ml agonistischem anti-Maus LTβR mAK stimuliert und die gewonnenen nukleären Zellextrakte in einem NFκB-ELISA eingesetzt (siehe 3.2.5). Mit diesem können die nach Aktivierung in den Zellkern eingewanderten Transkriptionsfaktoren auf ihre DNA-Bindungsfähigkeit untersucht werden.

4.1.3.1 Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges

Beim klassischen NFκB-Signalweg werden hauptsächlich Rel A und p50 aktiviert, welche als Heterodimere in den Zellkern wandern und zur Transkription der spezifischen Zielgene führen (siehe 1.2).

Nach der Stimulierung des LTβR können die beiden NFκB-Proteine Rel A und p50 im Zellkern der BFS-1-Fibrosarkomzellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 9).

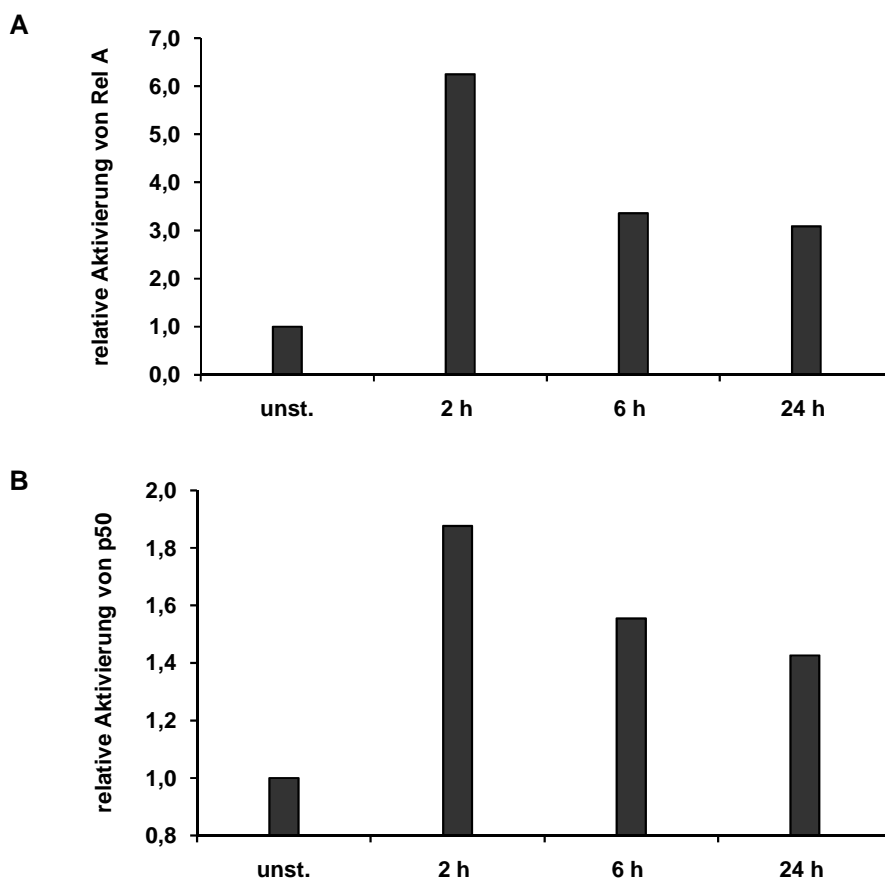


Abb. 9 Die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges in den Fibrosarkomzellen. Für den Versuch wurden BFS-1-Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät und für 2 h, 6 h und 24 h mit agonistischem anti-Maus LTβR mAK stimuliert. Die nukleären Zellextrakte wurden anschließend in einem NFκB-ELISA untersucht. Die Werte der unstimulierten Proben wurden jeweils gleich eins gesetzt und die Ergebnisse der Stimulationen darauf bezogen. **A:** Aktivierung von Rel A, **B:** Aktivierung von p50. Dargestellt ist jeweils eines von drei übereinstimmenden Experimenten. unst.= unstimuliert.

2 h nach Beginn der Stimulation der Fibrosarkomzellen nimmt sowohl die Konzentration von Rel A als auch p50 im Zellkern stark zu. Die Menge an Rel A verringert sich nach 6 h bzw. 24 h wieder, wobei sie in dieser Zeit annähernd gleich bleibt. Die Konzentration an p50 wird nach 6 h bzw. 24 h ebenfalls weniger. Hier ist eine konstante Abnahme der Aktivität des Transkriptionsfaktors zu beobachten (siehe Abb. 9).

4.1.3.2 Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges

Beim alternativen NF κ B-Signalweg werden hauptsächlich die beiden Proteine Rel B und p52 aktiviert. Diese wandern analog zum klassischen Signalweg als Heterodimer in den Zellkern und führen zu einer Transkription der entsprechenden Zielgene (siehe 1.2).

Nach Stimulierung des LT β R kommt es in den BFS-1-Zellen auch zu einer Translokation der beiden Proteine Rel B und p52 (siehe Abb. 10).

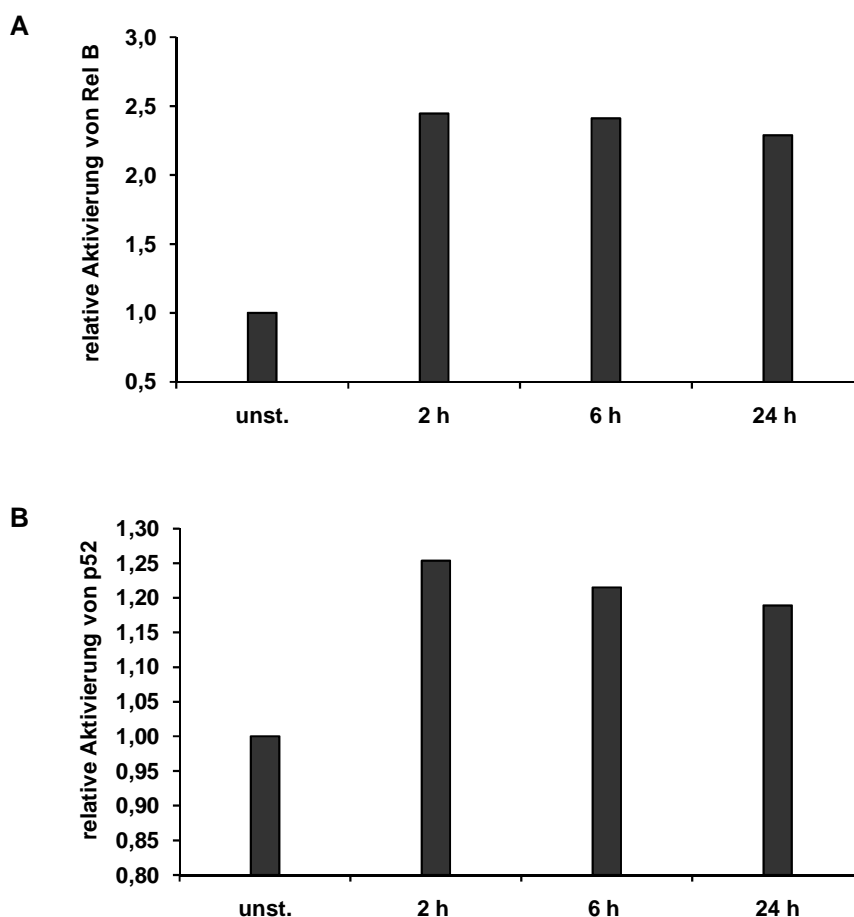


Abb. 10 Die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges in den Fibrosarkomzellen. Für den Versuch wurden BFS-1-Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät und für 2 h, 6 h und 24 h mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK stimuliert. Anschließend wurden die nukleären Zellextrakte in einem NF κ B-ELISA untersucht. Die Werte der unstimulierten Proben wurden jeweils gleich eins gesetzt und die Ergebnisse der Stimulationen darauf bezogen. **A:** Aktivierung von Rel B, **B:** Aktivierung von p52. Gezeigt ist jeweils eines von drei übereinstimmenden Experimenten. unst.= unstimuliert.

Sowohl die Menge an Rel B als auch an p52 ist 2 h nach Beginn der Stimulation des LT β R im Zellkern erhöht (siehe Abb. 10). Rel B bleibt über den ganzen Untersuchungszeitraum relativ konstant, wobei eine leichte Aktivitätsabnahme nach 24 h zu erkennen ist. Die Aktivierung von p52 ist von Grund auf geringer als die der anderen NF κ B-Proteine. Nach 6 h bzw. 24 h ist auch bei p52 eine geringgradige Reduktion zu beobachten.

4.1.4 Herstellung von BFS-1-Transfektanten mit Hemmung im klassischen (I κ B α SR) oder im alternativen (NIK DN) NF κ B-Signalweg

Beim klassischen NF κ B-Signalweg liegt das Rel A-p50-Heterodimer an I κ B α gebunden in inaktiver Form im Zytoplasma vor. Bevor der Transkriptionsfaktor in den Zellkern translozieren kann, kommt es zu einer Phosphorylierung und zum Abbau von I κ B α (siehe Abb. 4). Beim I κ B α SR sind die Aminosäuren S32 und S36, an denen die Phosphorylierung stattfindet, durch Alanine ausgetauscht (Iimuro et al., 1998), so dass der Abbau von I κ B α nicht mehr möglich ist. Somit ist die Induktion des klassischen NF κ B-Signalwegs blockiert.

Der erste Schritt bei der Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges ist die Stimulation der NF κ B-induzierenden Kinase (NIK) (siehe Abb. 4). Bei den folgenden Versuchen wurde eine dominant-negative Form von NIK (NIK DN oder NIK (KK429-430AA)) verwendet, bei der die beiden Lysine K429 und K430 durch jeweils ein Alanin ersetzt wurden (Holtmann et al., 1999). Durch diese Mutation kann NIK nicht mehr phosphoryliert und damit aktiviert werden. Eine Induktion des alternativen NF κ B-Signalwegs wird somit verhindert.

4.1.4.1 Herstellung der beiden Vektoren pcDNA3.1-I κ B α SR und pcDNA3.1-NIK DN

Für die Klonierung der beiden Konstrukte wurde das Plasmid pKS(+)Bluescript-I κ B α -gl. T7 M9493 S32A/S36A von der Arbeitsgruppe von Falk Weih und der Vektor pCS3MT-NIK (KK429-430AA) von der Arbeitsgruppe von David Wallach freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sowohl die cDNA für I κ B α SR als auch für NIK DN wurde in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 umklontiert, der neben der Ampicillin- auch eine Neomycin-Resistenz trägt.

4.1.4.1.1 Klonierung des pcDNA3.1-I κ B α SR-Vektors

Als Ausgangsvektor für die Klonierung diente das Plasmid pKS(+)Bluescript-I κ B α -gl. T7 M9493 S32A/S36A. Mit Hilfe der zwei Primer I κ B α for neu und I κ B α rev Xho I (siehe 2.7) erfolgte die Amplifikation der 944 bp langen cDNA von I κ B α , welches aus der Ratte stammt und die Mutationen S32A und S36A trägt. Bei der PCR wurde an das 5'-Ende eine BamHI- und an das 3'-Ende eine Xho I-Schnittstelle angefügt. Nach einem Zwischenklonierungsschritt in den pGEM-T-Easy-Vektor wurde das Insert schließlich in den pcDNA3.1 kloniert (siehe Abb. 11, A).

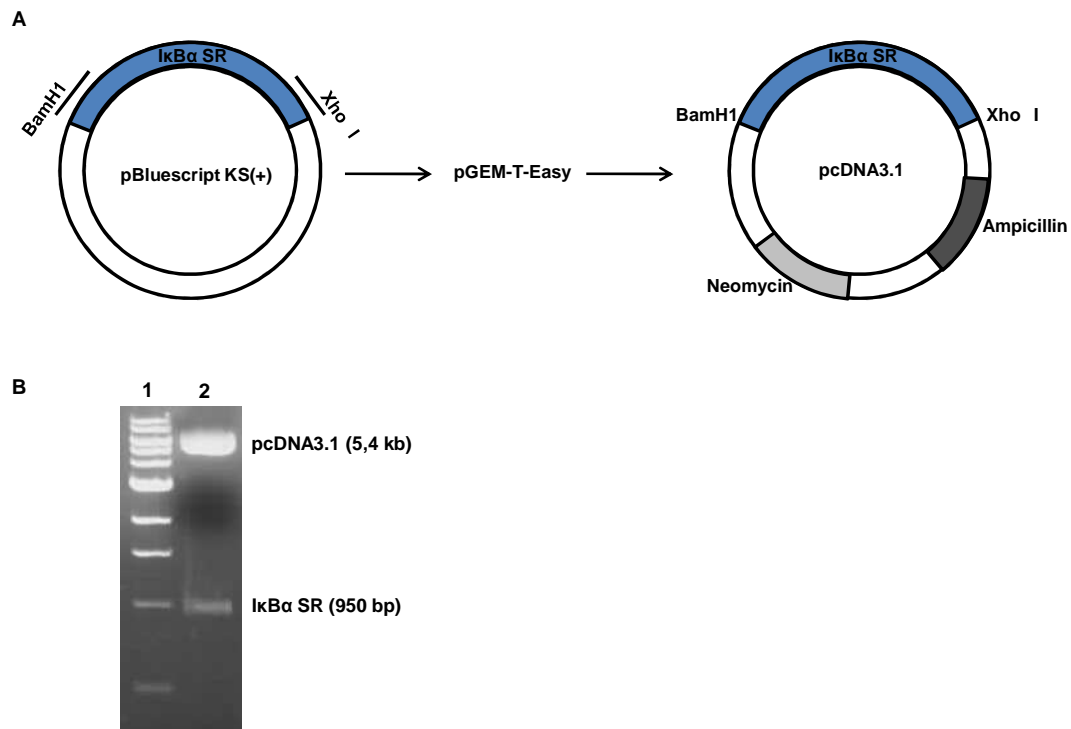


Abb. 11 Klonierung des pcDNA3.1-IκBα SR-Vektors. **A.** Klonierungsstrategie: mit Hilfe von Primern (IκBα for neu und IκBα rev Xho I) wurde die cDNA von IκBα SR amplifiziert und eine BamHI- und eine Xho I-Schnittstelle angefügt. Nach einer Zwischenklonierung in den pGEM-T-Easy-Vektor wurde IκBα SR in den pcDNA3.1 eingebracht. **B.** Testverdau des fertigen pcDNA3.1-IκBα SR mit BamHI und Xho I. 1: 1 kb-DNA-Standard, 2: Verdau.

Durch einen Testverdau mit BamHI und Xho I (siehe Abb. 11, B) und eine Sequenzierung mit T7- und SP6-Primern konnte die Richtigkeit des Konstrukts bestätigt werden.

4.1.4.1.2 Klonierung des pcDNA3.1-NIK DN-Vektors

Der Ausgangsvektor pCS3MT-NIK (KK429-430AA) enthält die vollständige 2841 bp lange cDNA des humanen NIK, an die am 5'-Ende ein 6x Myc-Tag angefügt ist. Dieses Insert wurde mit einem BamHI/Xho I-Verdau komplett ausgeschnitten und in den pcDNA3.1 kloniert (siehe Abb. 12, A).

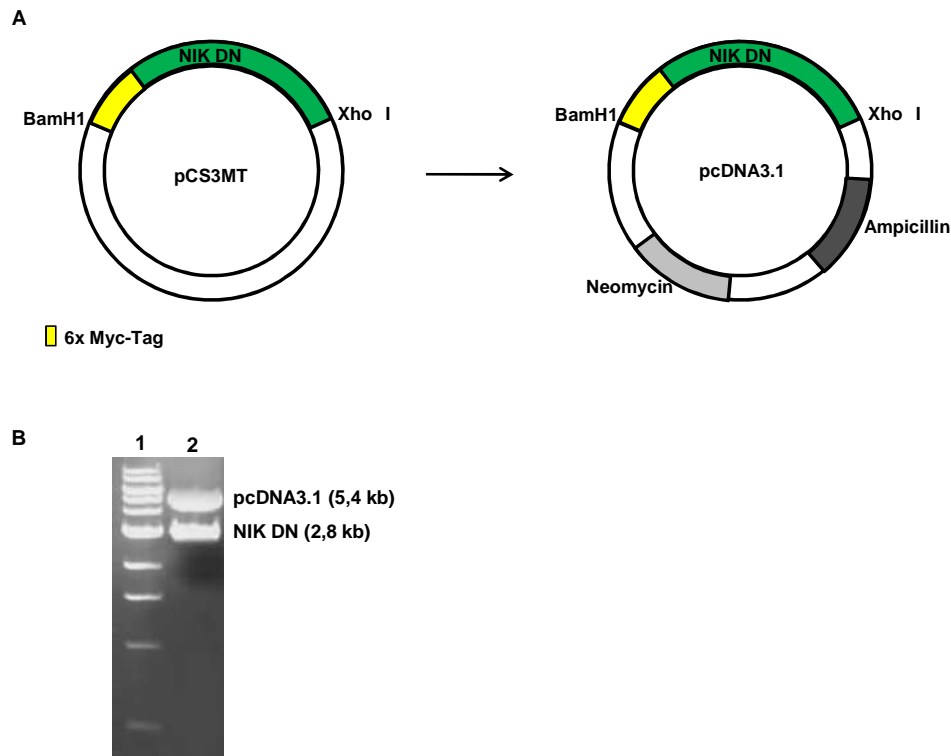


Abb. 12 Klonierung des pcDNA3.1-NIK DN-Vektors. **A.** Klonierungsstrategie: die humane NIK DN-cDNA mit einem 6x Myc-Tag am 5'-Ende wurde aus dem pCS3MT-Plasmid mit einem BamHI/ Xho I-Doppelverdau ausgeschnitten und in pcDNA3.1 kloniert. **B.** Testverdau des fertigen pcDNA3.1-IkBa SR mit BamHI und Xho I. 1: 1 kb-DNA-Standard, 2: Verdau.

Auch hier konnte die Richtigkeit der Klonierung mit Hilfe eines Testverdaus mit BamHI und Xho I (siehe Abb. 12, B) und einer Sequenzierung mit T7- und SP6-Primer bestätigt werden.

4.1.4.2 Vergleich der transfizierten Zellen (BFS-1-IkBa SR und BFS-1-NIK DN) mit den wt-Fibrosarkomzellen

Die BFS-1-Fibrosarkomzellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3.1-IkBa SR und pcDNA3.1-NIK DN transfiziert und mit Neomycin (G418) selektiert. Als Vektorkontrolle wurden die Fibrosarkomzellen auch mit dem pcDNA3.1-Leervektor transfiziert. Zwischen den BFS-1 Wildtypzellen und den BFS-1-pcDNA3.1 wurden keine Unterschiede im Wachstumsverhalten *in vitro* festgestellt (Daten nicht gezeigt). Daher wurden für die folgenden Versuche wt-Fibrosarkomzellen als Kontrolle verwendet.

4.1.4.2.1 Wachstumsgeschwindigkeit *in vitro*

Für die Erstellung einer Wachstumskurve wurden die Fibrosarkomzellen (wt, IkBa SR und NIK DN) in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/Well ausgesät und anschließend für 4

Tage die Zellzahl/Well bestimmt. Pro Tag und Zelltyp wurden dabei jeweils drei Wells ausgezählt.

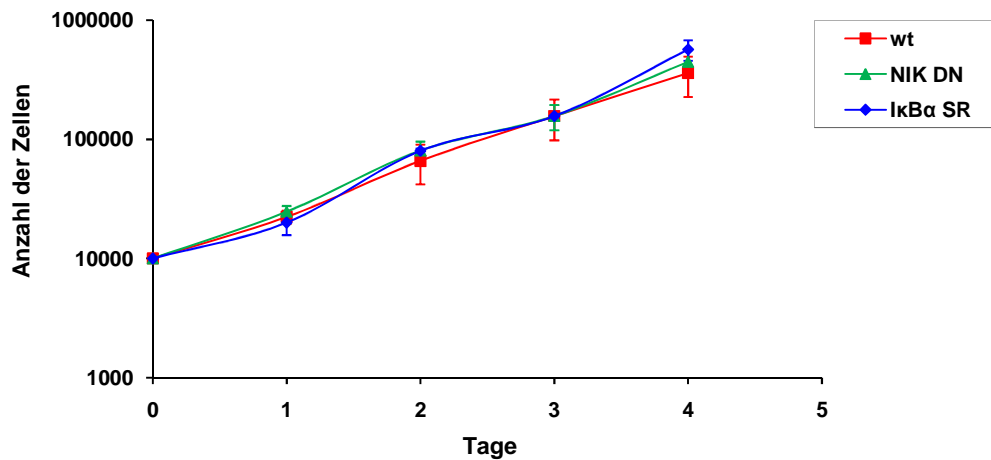


Abb. 13 Wachstumskurve der BFS-1-Fibrosarkomzellen (wt, IkBα SR und NIK DN). Die Zellen wurden zunächst in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/Well ausgesät und anschließend täglich ausgezählt. Die Zellzahl wurde pro Tag und Zelltyp in jeweils drei Wells bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Anhand der Wachstumskurve (siehe Abb. 13) wird deutlich, dass sowohl die mit pcDNA3.1-IkBα SR als auch die mit pcDNA3.1-NIK DN stabil transfizierten BFS-1 Fibrosarkomzellen das gleiche Wachstumsverhalten *in vitro* zeigen wie die Wildtypzellen.

4.1.4.2.2 FACS-Analyse der Expression des LTβR

Durch die Transfektion der Zellen mit Plasmiden, die zur Hemmung von jeweils einem der beiden NFκB-Signalwege führen, könnte die Expression verschiedener Proteine beeinflusst werden. Um auszuschließen, dass die Expression des LTβR auf den Fibrosarkomzellen beeinträchtigt ist, wurden diese mit anti-Maus-LTβR mAK gefärbt und mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert.

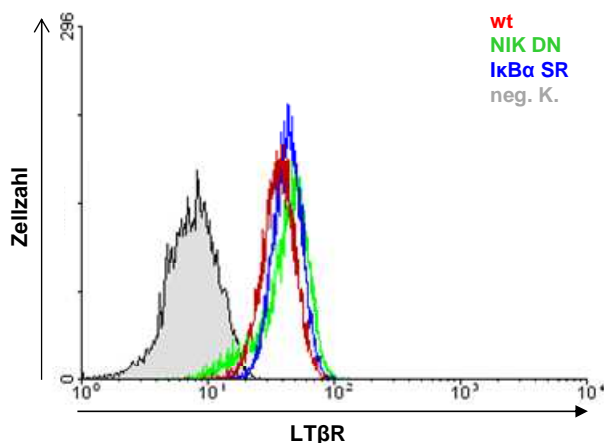


Abb. 14 FACS-Analyse der Fibrosarkomzellen (BFS-1 wt, NIK DN, IkBα SR). Die Zellen wurden mit anti-Maus LTβR mAK gefärbt und anschließend mittels eines Durchflusszytometers vermessen.

Sowohl die I κ B α SR- als auch die NIK DN-Transfektanten zeigen bezüglich der LT β R-Expression keine Unterschiede gegenüber den Kontrollzellen (siehe Abb. 14).

4.1.4.3 MIP-2-Expression der I κ B α SR- und NIK DN-Transfektanten

Wie bereits erwähnt führt die Aktivierung des LT β R in den BFS-1-Fibrosarkomzellen zu einer erhöhten Expression von MIP-2. Desweiteren trägt der Promotor des MIP-2-Gens eine konservierte NF κ B-Konsensus-Sequenz (Widmer et al., 1993). So wurde in einigen Studien beschrieben, dass die Expression von MIP-2 vom klassischen NF κ B-Signalweg abhängig ist (Driscoll, 2000; Kim et al., 2003). Außerdem beschreibt eine aktuelle Veröffentlichung, dass das MIP-2-Gen auch durch den alternativen NF κ B-Signalweg reguliert werden kann (Yang et al., 2008).

Um zu untersuchen, welcher NF κ B-Signalweg nach der Stimulation des LT β R für die Regulation der Expression von MIP-2 in den BFS-1-Fibrosarkomzellen verantwortlich ist, wurden die mit I κ B α SR und mit NIK DN transfizierten BFS-1 und die Wildtypzellen (Positivkontrolle) in 24-Well-Platten ausgesät und nach einem Tag für weitere 24 h mit 10 μ g/ml agonistischem anti-Maus-LT β R mAK stimuliert. Anschließend erfolgte aus dem Kulturüberstand der Zellen die Bestimmung der MIP-2-Konzentration.

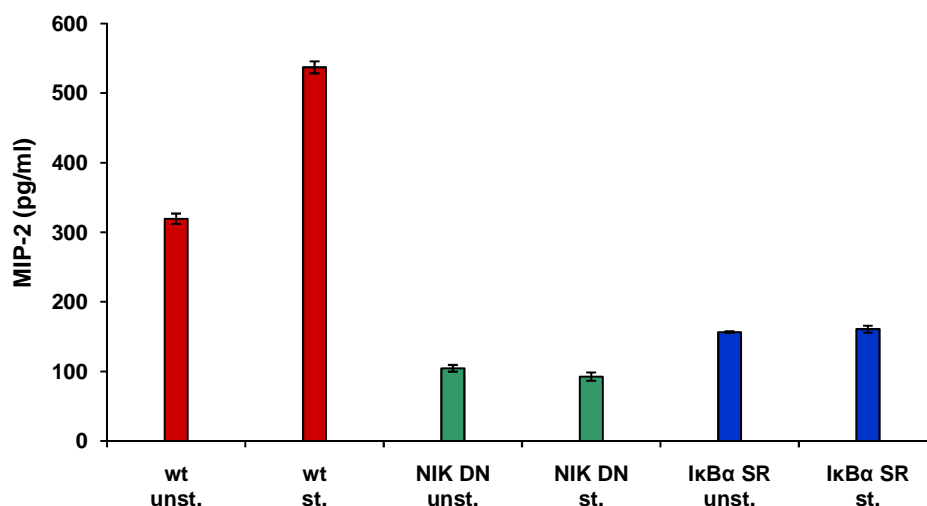


Abb. 15 MIP-2-Konzentration der transfizierten Fibrosarkomzellen. BFS-1 wt, NIK DN, I κ B α SR wurden in 24-Well-Platten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml im Triplikat ausgesät und nach einem Tag für 24 h mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK (5G11b) stimuliert. Danach wurde im Kulturüberstand die MIP-2-Konzentration bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. unst.= unstimuliert, st.= stimuliert. Daten sind repräsentativ für drei Experimente.

Die I κ B α SR- und NIK DN-Transfektanten zeigen ohne äußere Stimuli bereits eine stark verminderte Expression von MIP-2 im Vergleich zu den wt-Zellen. Außerdem führt die Stimulation des LT β R nicht wie bei der Positivkontrolle zu einer Erhöhung der Konzentration

an MIP-2 im Überstand (siehe Abb. 15). Somit sind wahrscheinlich beide NF κ B-Signalwege an der Regulation der MIP-2-Expression in den BFS-1-Fibrosarkomzellen beteiligt.

4.1.4.4 NF κ B-Aktivierung in den I κ B α SR- und NIK DN-Transfektanten

Für die Bestimmung der NF κ B-Aktivierung in I κ B α SR- und NIK DN-Transfektanten wurde wie in 4.1.3 vorgegangen. Die Stimulation mit agonistischem anti-Maus-LT β R mAK erfolgte für 2 h und 6 h. Als Vergleichswert wurde die Aktivierung der Signalwege in den wt-BFS-1-Fibrosarkomzellen herangezogen.

4.1.4.4.1 Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges

Da I κ B α das Rel A-p50-Heterodimer bei unstimulierten Zellen im Zytoplasma bindet und damit im klassischen NF κ B-Signalweg eine zentrale Rolle spielt, sollte die I κ B α SR-Transfektante nur in diesem Signalweg beeinträchtigt sein. Bei den NIK DN-Fibrosarkomzellen hingegen ist zu erwarten, dass die Rekrutierung von Rel A und p50 wie in den wt-Zellen verläuft.

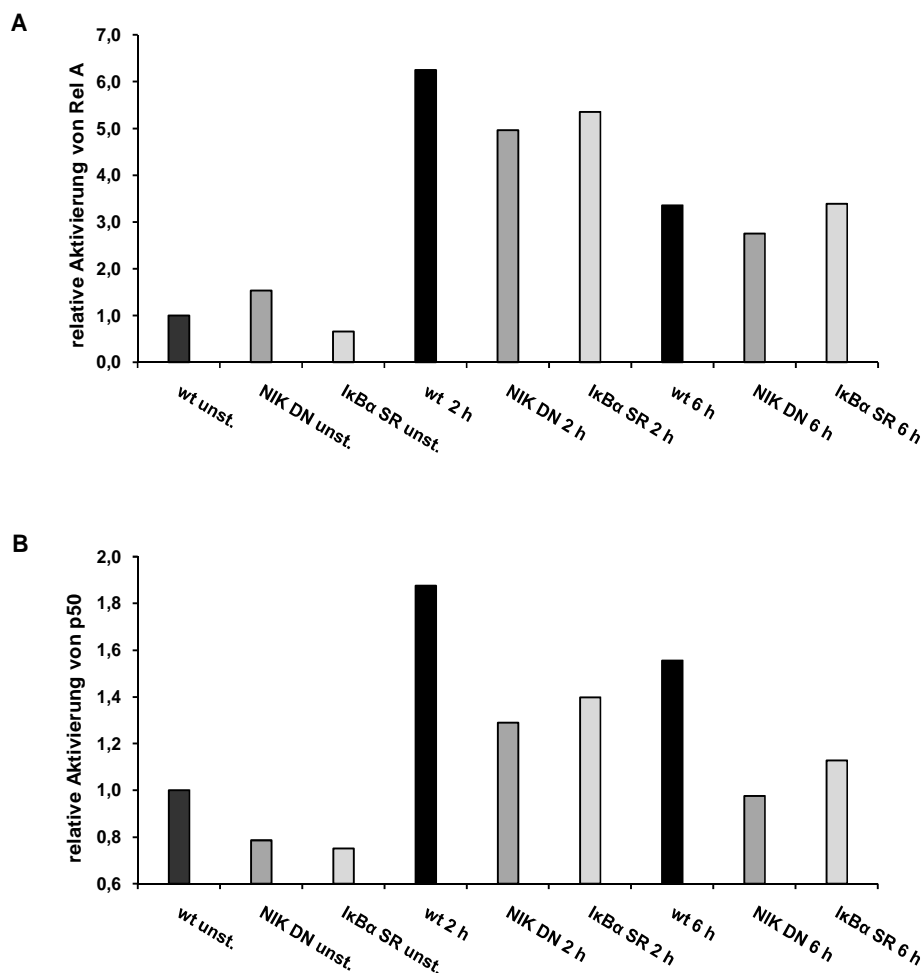


Abb. 16 Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs – Vergleich zwischen BFS-1 wt, I κ B α SR und NIK DN. Für den Versuch wurden die Fibrosarkomzellen in 10 cm-Schalen ausgesät und für 2 h und 6 h mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK stimuliert. Die nukleären Zellextrakte wurden anschließend in einem NF κ B-ELISA untersucht. Die unstimulierte Probe wurde bei den jeweiligen Zelltypen gleich eins gesetzt und die 2 h- und 6 h-Werte darauf bezogen. **A:** Aktivierung von Rel A, **B:** Aktivierung von p50. Gezeigt ist eines von drei übereinstimmenden Experimenten. unst.= unstimuliert.

Bei allen drei Zelltypen wurden im unstimulierten Zustand vergleichbare Mengen an Rel A detektiert (siehe Abb. 16, A). Nach der zweistündigen Stimulierung mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK ist die Konzentration an Rel A im Zellkern nicht nur bei den I κ B α SR- sondern auch bei den NIK DN-Transfektanten leicht verringert. Nach 6 h ist zwischen den wt- und den I κ B α SR-Zellen bezüglich der Rekrutierung von Rel A kein Unterschied mehr zu erkennen. Bei den NIK-DN-Transfektanten ist die Einwanderung von Rel A in den Zellkern jedoch noch in geringem Maße beeinträchtigt.

Bei p50 liegen die Werte beider Transfektanten sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach 2 bzw. 6 h der Inkubation mit agonistischem anti-Maus LT β R AK deutlich unter denen der wt-Fibrosarkomzellen (siehe Abb. 16, B). Die Rekrutierung von p50 in den Zellkern ist bei den I κ B α SR- und den NIK DN-Zellen ungefähr um 60 % im Vergleich zum Wildtyp verringert.

Der klassische NF κ B-Signalweg wird somit nicht nur durch die Transfektion mit pcDNA3.1-I κ B α SR sondern auch mit pcDNA3.1-NIK DN beeinflusst.

4.1.4.4.2 Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges

Der erste Schritt bei der Stimulation des alternativen NF κ B-Signalwegs ist die Aktivierung von NIK. Demnach sollte in Fibrosarkomzellen, die mit dem Plasmid pcDNA3.1-NIK DN transfiziert sind, nur der alternative Weg blockiert sein. Bei den I κ B α SR-Zellen würde man erwarten, dass die Komponenten des alternativen Signalweges nach Stimulation des LT β R genauso aktiviert werden wie bei den wt-Fibrosarkomzellen.

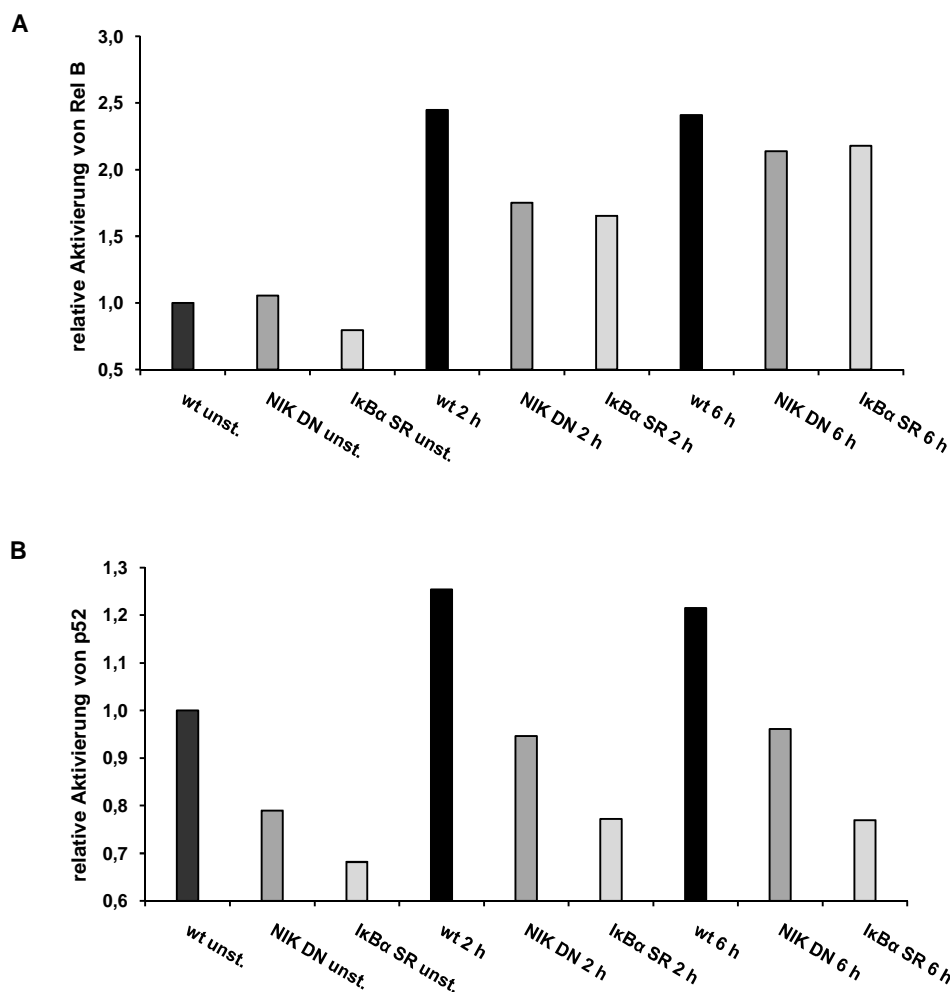


Abb. 17 Aktivierung des alternativen NFκB-Signalwegs – Vergleich zwischen BFS-1 wt, IκBα SR und NIK DN. Für den Versuch wurden die Fibrosarkomzellen in 10 cm-Schalen ausgesät und für 2 h und 6 h mit agonistischem anti-Maus LTβR mAK stimuliert. Die nukleären Zellextrakte wurden anschließend in einem NFκB-ELISA untersucht. Die unstimulierte Probe wurde bei den jeweiligen Zelltypen gleich eins gesetzt und die 2 h- und 6 h-Werte darauf bezogen. **A:** Aktivierung von Rel B, **B:** Aktivierung von p52. Dargestellt ist eines von drei übereinstimmenden Experimenten. unst.= unstimuliert.

Anhand von Abb. 17 A ist dargestellt, dass die Ausgangswerte von Rel B in allen drei Zelltypen im unstimulierten Zustand vergleichbar sind. Beide Transfektanten (IκBα SR und NIK DN) zeigen nach der Stimulierung für 2 h und 6 h eine geringere Rekrutierung von Rel B in den Zellkern als die wt-Fibrosarkomzellen, wobei nach 2 h der größte Unterschied zu beobachten ist. Somit führt die Transfektion mit pcDNA3.1-NIK DN nicht nur zur Beeinträchtigung des alternativen, sondern auch des klassischen NFκB-Signalwegs. Umgekehrt ist bei den IκBα SR-Zellen neben dem klassischen auch der alternative Signalweg beeinflusst.

P52 zeigt nach der Stimulation des LTβR in den BFS-1-Wildtypzellen von allen NFκB-Proteinen die geringste Aktivierung. Sowohl nach 2 h als auch nach 6 h liegen die Werte der

beiden stabil transfizierten Zellen unter denen der unstimulierten wt-Fibrosarkomzellen (siehe Abb. 17, B). Außerdem werden in den I κ B α SR-Zellen sogar noch geringere Mengen an p52 in den Zellkern rekrutiert als in den NIK DN-Fibrosarkomzellen.

4.1.4.5 Das BFS-1-Tumormodell mit den Transfektanten (I κ B α SR und NIK DN)

Da bei den mit I κ B α SR und NIK DN transfizierten Zellen die Aktivierung beider NF κ B-Signalwege und infolgedessen auch die Expression von MIP-2 verringert ist, sollen die Auswirkungen dieser Beeinträchtigungen im *in vivo*-Tumormodell untersucht werden. Dazu wurden $1,5 \times 10^5$ transfizierte Zellen in einem Volumen von 50 μ l subkutan (s.c.) in C57BL/6-Mäuse injiziert. Als Kontrolle dienten die Wildtypfibrosarkomzellen.

4.1.4.5.1 Wachstumsverlauf

Nach der Injektion (s.c.) der BFS-1-Fibrosarkomzellen waren nach vier bis fünf Tagen die ersten Tumore tastbar. Diese wurden im Verlauf des Versuchs jeden zweiten Tag vermessen.

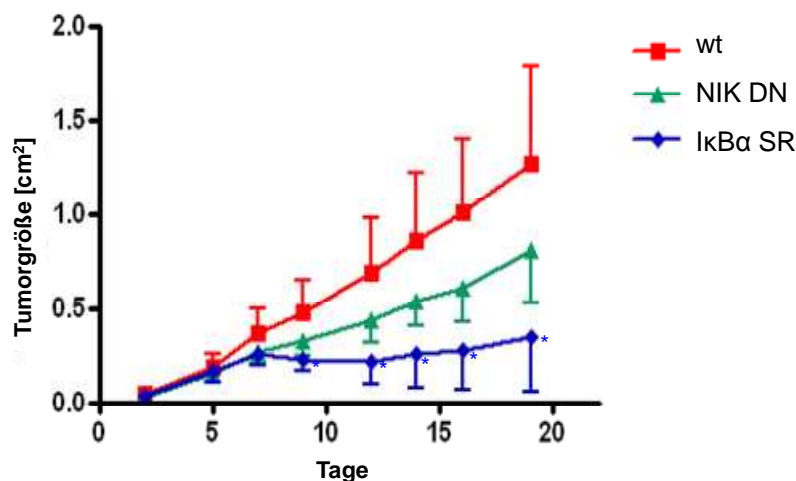


Abb. 18 Tumorwachstum der Fibrosarkomzellen auf C57BL/6-Mäusen - Vergleich zwischen wt, NIK DN und I κ B α SR. Die Tumore wurden jeden zweiten Tag mit der Schieblehre vermessen und die Länge und Breite bestimmt. Die Tumorgroße ist als cm² aufgetragen. Die Gruppengröße war: wt= 9, NIK DN= 10, I κ B α SR= 10. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Ab Tag 9 zeigt sich im Tumorwachstum zwischen wt und I κ B α SR ein statistisch signifikanter Unterschied (*p<0,005).

Wie in Abb. 18 zu sehen ist, zeigen sowohl die Tumore aus den I κ B α SR- als auch die aus den NIK DN-Transfektanten ein verringertes Wachstum im Vergleich zu den Wildtypfibrosarkomzellen. Dabei liegt die Größe der I κ B α SR-Tumore unterhalb der aus den NIK-DN-Transfektanten. Der Unterschied zwischen den Tumoren aus wt-Zellen und denen aus den I κ B α SR-Transfektanten ist statistisch signifikant (p<0,005). Einige Tumore, die aus den transfizierten Zellen entstanden sind, fingen zunächst normal zu wachsen an. Nach kurzer

Zeit blieb bei ihnen jedoch der Größenzuwachs aus oder es kam zum Teil sogar zu einem Rückgang der Tumore. Dieses Phänomen konnte man hauptsächlich bei den I κ B α SR-Tumoren beobachten.

4.1.4.5.2 Tumorgewicht

Neben dem Wachstumsverlauf wurde auch das Gewicht der Tumore am Ende des Versuchs bestimmt (Tag 19). Dazu wurden die Tumore präpariert und gewogen.

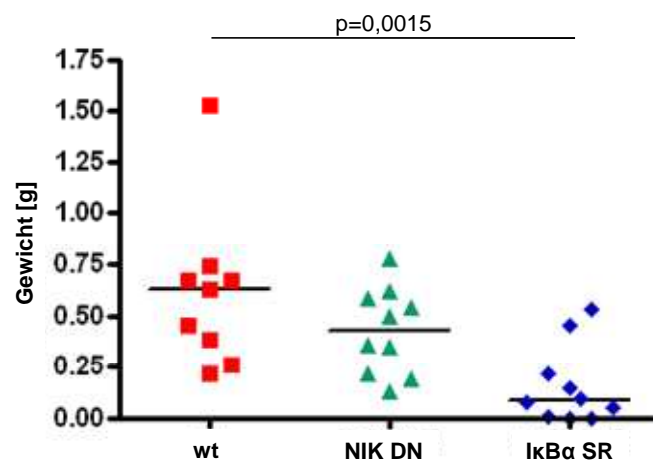


Abb. 19 Gewicht der wt-, der NIK DN- und der I κ B α SR-Tumore am Tag 19. Am Ende des Versuchs wurden die Tumore präpariert und gewogen. Angegeben sind die Einzelwerte der Tumorgewichte mit dem dazugehörigen Median. Der Unterschied zwischen wt und I κ B α SR ist statistisch signifikant ($p=0,0015$). Gruppengröße siehe Abb. 18.

Die Tumore, die aus den transfizierten Zellen entstanden sind, zeigen ein geringeres Gewicht im Vergleich zu denen aus Wildtypfibrosarkomzellen (siehe Abb. 19). Der Unterschied zwischen wt- und I κ B α SR-Tumoren ist wie auch schon der Wachstumsverlauf statistisch signifikant ($p=0,0015$).

4.1.4.5.3 MIP-2-Expression der Tumore *ex vivo*

Um zu untersuchen, wie groß die Expression des proangiogenen MIP-2 in den Tumoren ist, wurden diese am Ende des Versuchs (Tag 19) aus den Mäusen präpariert, in kleine Stücke geschnitten und gewogen. Diese wiederum wurden für 4 h in 48-Well-Platten mit Medium gegeben, anschließend die Konzentration an MIP-2 im Überstand bestimmt und auf 10 mg Tumorgewebe umgerechnet.

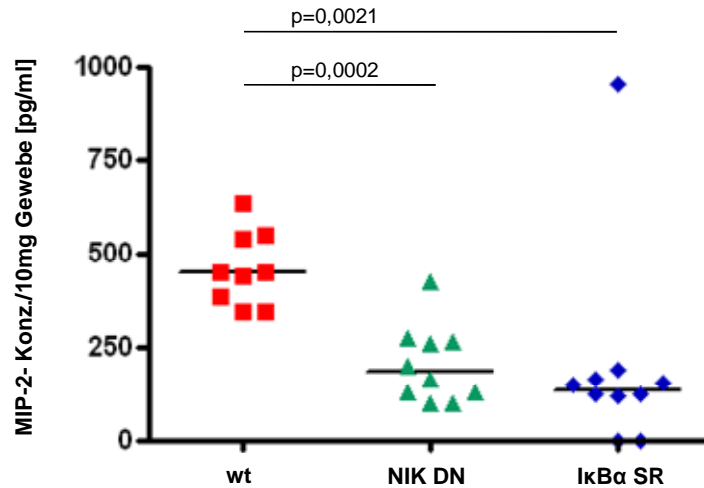


Abb. 20 MIP-2-Expression der Tumore *ex vivo*. Die Tumore wurden am Tag 19 präpariert und in kleine Stücke geschnitten. Diese wurden anschließend gewogen und für 4 h in Kultur genommen. Die Bestimmung der MIP-2-Konzentration erfolgte aus dem Überstand. Die MIP-2-Expression wurde auf 10 mg Tumorgewebe umgerechnet. Angegeben ist ein Wert pro Maus und Tumor mit den dazugehörigen Medianen. Die Unterschiede zwischen wt und NIK DN ($p=0,0002$) und wt und IκBα SR ($p=0,0021$) sind statistisch signifikant.

Wie in Abb. 20 zu sehen ist, exprimieren die Tumore, die aus beiden transfizierten BFS-1-Zellen entstanden sind, signifikant weniger proangiogenes MIP-2 als die Tumore, die aus den Wildtypzellen hervorgegangen sind (wt-NIK DN: $p=0,0002$; wt-IκBα SR: $p=0,0021$).

4.2 Die Rolle der LT β R-Aktivierung bei Angiogenese und Tumorwachstum im humanen System

Da im BFS-1-Tumormodell gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des LT β R auf den Fibrosarkomzellen zur Erhöhung der MIP-2-Expression und dadurch zum verstärkten Tumorwachstum *in vivo* führt, stellte sich die Frage, ob dieser Befund auch auf das humane System übertragen werden kann. Zunächst lag daher das Augenmerk auf der Herstellung monoklonaler Maus-anti-huLT β R Antikörper. Anschließend sollte die Stimulation der Expression von IL-8, dem funktionellen humanen Homolog zum MIP-2 in der Maus, untersucht werden. Für die Stimulationsexperimente kamen sowohl frisches humanes Tumormaterial als auch humane Tumorzelllinien zur Verwendung. Der Promotor des IL-8-Gens beinhaltet wie das MIP-2-Gen eine NF κ B-Bindungsstelle (Xie, 2001). Außerdem führt eine Aktivierung des humanen LT β R zu einer Erhöhung der IL-8-Expression, welche über den NF κ B-Signalweg vermittelt wird (Chang et al., 2002). Somit stellte sich die Frage, welcher der beiden NF κ B-Signalwege bei der Induktion der IL-8-Expression in humanen Tumorzellen nach der Stimulation des LT β R aktiviert wird.

4.2.1 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler anti-huLT β R Antikörper

Für die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den humanen LT β R wurde zunächst rekombinantes LT β R-Protein exprimiert und gereinigt werden. Nach der Immunisierung von Mäusen mit dem rekombinanten Protein erfolgte die Generierung von antikörperproduzierenden Hybridomen mittels einer Zellfusion. Die hergestellten Antikörper wurden anschließend auf ihre Funktionalität hin untersucht.

4.2.1.1 Klonierung des Expressionsplasmids *pQE-32-huLT β R*

Der für die Klonierung verwendete Vektor *pQE-32* ist speziell für die Expression großer Mengen an rekombinantem Protein in *E. coli* konzipiert worden (siehe Abb. 21).

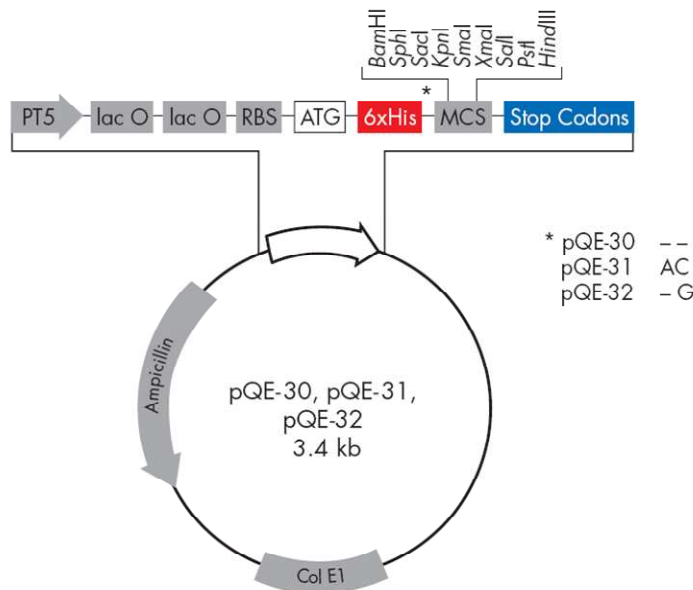


Abb. 21 Darstellung des pQE-32-Vektors.¹ PT5= T5-Promotor, lac O= lac-Operator, RBS= ribosome binding site, ATG= Start-Codon, 6xHis= 6x His-Tag-Sequenz, MCS= multiple cloning site, Stop Codons= Stopp-Codons in allen drei Reading-Frames, Col E1= Col E1 origin of replication, Ampicillin= Ampicillin-Resistenzgen. Der Vektor wurde speziell für die Expression von Proteinen in *E. coli* konzipiert.

Das Plasmid enthält ein optimiertes Promotor-Operator-Element, das aus dem T5-Phagen-Promotor, der durch die RNA-Polymerase in *E. coli* erkannt wird, und aus zwei Sequenzen des lac-Operators besteht. Diese sind vorhanden, um die Bindung der lac-Repressoren, die von einem zweiten Plasmid (siehe 4.2.1.2) codiert werden, zu erhöhen und den starken T5-Promotor effizient zu hemmen. Zum Erreichen hoher Translationsraten sind zusätzlich synthetische Ribosomen-Bindungsstellen (RBS) vor dem Start-Codon eingefügt. Die Termination der Translation wird durch Stopp-Codons, die in allen drei Reading-Frames vorhanden sind, gewährleistet. Der pQE-32-Vektor enthält außerdem als 6x His-Tag das RGS-His-Epitop, das vor dem N-Terminus des exprimierten Proteins liegt und zur Aufreinigung sowie zur Detektion verwendet werden kann (siehe Abb. 21).

Die kodierende Sequenz des humanen LTβR hat eine Länge von 1305 bp. Durch die Translation entsteht ein Protein mit 435 Aminosäuren (AS) und einem apparenten Molekulargewicht von ca. 46,7 kDa. Der huLTβR setzt sich aus einem Signalpeptid (1-27 AS), einer extrazellulären Domäne (28-225 AS, 82-675 bp), einem Transmembranbereich (226-248 AS) und einer zytoplasmatischen Domäne (249- 435 AS) zusammen. Für die Expression des rekombinanten huLTβR wurde zunächst der Bereich zwischen den Basen 94 bis 672 (579 bp und 193 AS), was bis auf 5 Aminosäuren der extrazellulären Domäne (EZD) entspricht, in den pQE-32-Vektor kloniert. Dafür wurde die entsprechende Sequenz aus dem pcDNA3-hLTβR-Plasmid, das die komplette cDNA des huLTβR enthält, mittels PCR

¹ The QIAexpressionist, 2003

amplifiziert und an das 5'-Ende eine BamH1- und an das 3'-Ende eine Hind III-Schnittstelle angefügt. Nach einem Zwischenschritt im pGEM-T-Easy-Vektor erfolgte die Endklonierung der EZD des huLT β R in den pQE-32.

Durch einen Testverdau mit BamH1 und Hind III und eine Sequenzierung mit den Primern pQE_for und pQE_rev konnte die Richtigkeit der Klonierung der cDNA des humanen LT β R bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.1.2 Expression der EZD des huLT β R in *E. coli*

Zur Expression der EZD des huLT β R wurde das klonierte pQE-32-Plasmid (siehe 4.2.1.1) zunächst in den *E.coli*-Stamm M15 transformiert. Um zu überprüfen, ob das rekombinante Protein in den transformierten M15-Zellen exprimiert wird, wurde wie in 3.1.6.1 vorgegangen. Die erhaltenen Proben (Negativkontrolle, nicht induziert und induziert) wurden schließlich mit Hilfe einer Gelelektrophorese analysiert.

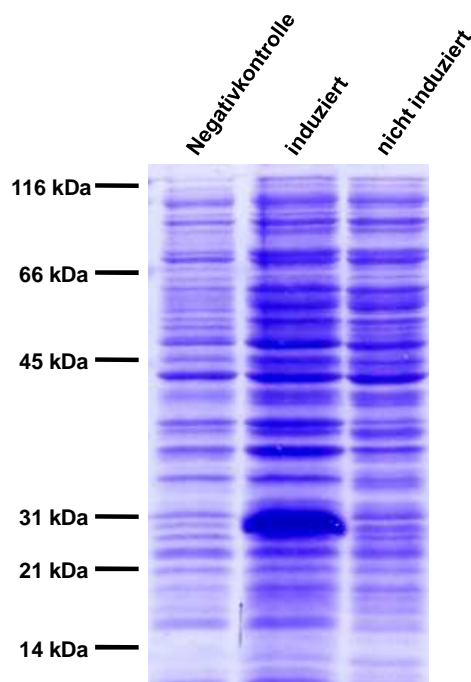


Abb. 22 Gelelektrophorese von induzierten und nicht induzierten *E. coli*, die mit pQE-32-huLT β R transformiert waren. Die entsprechenden Bakterien wurden in 100 ml Medium bis zu einer OD von ca. 0,6 anwachsen gelassen. Danach wurde eine Probe entnommen (= Negativkontrolle) und die restliche Bakteriensuspension in zwei Hälften aufgeteilt: die eine blieb uninduziert, zur anderen wurde IPTG (Endkonzentration 1 mM) gegeben. Nach 5 h wurde jeweils eine Probe entnommen und zusammen mit der Negativkontrolle mittels eines SDS-Gels mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

Wie man auf dem SDS-Gel deutlich sehen kann, ist bei der induzierten Probe eine Bande bei ca. 30 kDa vorhanden, die bei der Negativkontrolle und der nicht induzierten Probe fehlt (siehe Abb. 22). Das berechnete Molekulargewicht der EZD des huLT β R liegt ungefähr bei 22 kDa. Da die EZD des huLT β R zusätzlich einen His-Tag trägt, wurde das richtige Protein exprimiert.

Für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurden größere Mengen an Bakterien benötigt. Die Induktion erfolgte wie oben beschrieben, allerdings wurde in einem Ansatz bis

zu 1 l Medium verwendet. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Bakterien unter nativen Bedingungen (siehe 3.1.6.2).

4.2.1.3 Aufreinigung der EZD des huLT β R unter nativen Bedingungen

Bei der Aufreinigung von Proteinen, die mit Hilfe von pQE-Vektoren exprimiert werden, macht man sich die Ni-NTA-Technologie zunutze. Dabei bindet der 6x His-Tag des rekombinanten Proteins an die Ni-NTA-Agarose. Bakterielle Proteine hingegen zeigen nur schwache oder keine Affinität zum Ni-NTA und können durch mehrere Waschschrte entfernt werden. Anschließend erfolgt die Elution des gewünschten Proteins durch die Zugabe von Imidazol, das mit dem Histidin konkurriert.

Das aus den induzierten M15-Bakterien gewonnene Lysat wurde für die Aufreinigung zunächst mit Ni-NTA-Agarose versetzt und 1 h bei 4°C inkubiert. Während dieser Zeit bindet das rekombinante Protein an den Ni-NTA-Komplex. Nach mehreren Waschschrten konnte die EZD des huLT β R schließlich eluiert werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, wie hoch die Reinheit des exprimierten Proteins ist und ob es sich wirklich um die EZD des huLT β R handelt, wurde ein Western Blot mit anti-His RGS Antikörper durchgeführt.

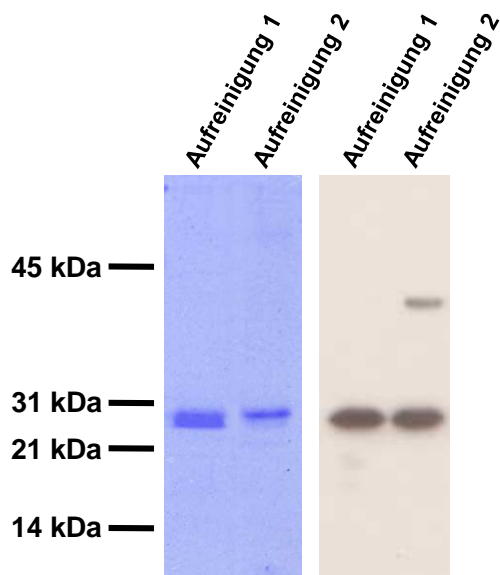


Abb. 23 Western Blot zweier verschiedener Aufreinigungen der EZD der huLT β R. Das rekombinante Protein wurde mittels Ni-NTA-Agarose gereinigt (siehe 3.1.6.3) und mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Der dafür verwendete anti-His Antikörper wurde speziell für den Nachweis von His-Tags aus pQE-Vektoren konzipiert. Gezeigt ist auf der rechten Seite der Western Blot und auf der linken Seite das dazugehörige SDS-Gel.

Beim Western Blot (siehe Abb. 23) zeigte sich, dass die rekombinante EZD des huLT β R eine sehr hohe Reinheit aufweist und eine Größe von ungefähr 30 kDa hat. In zwei unterschiedlichen Eluatn sind auf dem SDS-Gel keine weiteren Banden, auf dem Western Blot nur eine weitere Bande bei der Aufreinigung 2 zu sehen. Somit konnten die rekombinant

exprimierten Proteine nach Dialyse und Konzentrationsbestimmung für die Immunisierung von Mäusen für die Herstellung von anti-huLT β R mAK verwendet werden.

4.2.1.4 Immunisierung von Balb/c-Mäusen

Mit der in *E. coli* exprimierten und gereinigten EZD des huLT β R wurden zwei weibliche Balb/c-Mäuse immunisiert (siehe 3.3.1). Zur Bestimmung der IgG-Titer im Serum der Tiere wurde zwischen den Immunisierungen jeweils ein ELISA durchgeführt (siehe 3.1.7.1). Durch den Einsatz eines Zweiantikörpers, der γ -Ketten-spezifisch ist, sollten nur anti-huLT β R Antikörper des Isotyps IgG detektiert werden. Im Diagramm erfolgte die Auftragung der Verdünnungen auf der x-Achse gegen die OD (405 nm) auf der y-Achse. Aus den Wendepunkten der entstandenen Kurven lässt sich schließlich der exakte Titer ablesen, wobei dieser der Verdünnung entspricht, bei der die Antigenbindung auf 50 % des Maximalwertes abfällt. Der Titer lag am Tag der Fusion bei beiden Mäusen bei Serumverdünnungen von ca. 1:25000 (siehe Abb. 24).

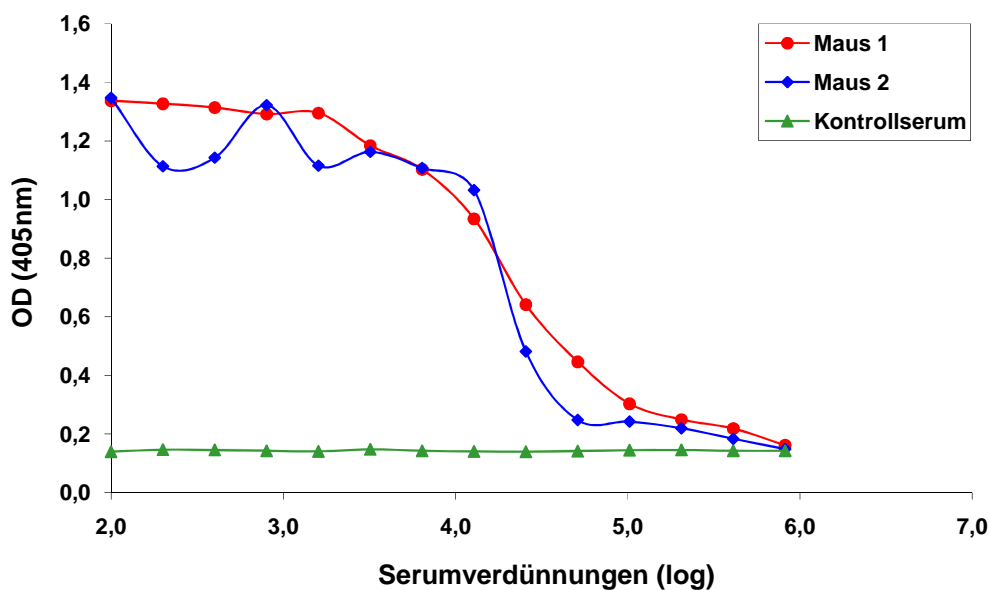


Abb. 24 Nachweis spezifischer anti-huLT β R Antikörper im Serum der immunisierten Mäuse mittels ELISA. Die Beschichtung der 96-Well-Platte erfolgte mit huLT β R-Ig (aus *Drosophila*-S2-Zellen). Das Serum wurde ausgehend von 1:100 in Zwischenschritten verdünnt und eingesetzt. Als Zweitantikörper diente ein γ -Ketten-spezifischer anti-Maus IgG Antikörper. Die Serumverdünnungen wurden auf der x-Achse gegen die OD bei 405 nm auf der y-Achse. Der Titer der Tiere ergibt sich aus dem Wendepunkt der erhaltenen Kurven und liegt bei beiden Mäusen bei ca. 1:25000. Als Kontrolle (grün) wurde das Serum einer nicht immunisierten Maus verwendet.

4.2.1.5 Herstellung antikörperproduzierender Hybridome

Die Fusion, die mit der Milz der Maus 1 durchgeführt wurde, folgte dem Protokoll, das im Abschnitt 3.3.5 beschrieben ist. Nach ungefähr sieben bis acht Tagen waren die ersten Klone sichtbar. Insgesamt wurden die Überstände von 553 Hybridomklonen auf die Produktion von anti-huLT β R mAK getestet. Um zu verhindern, dass Hybridome, die Antikörper gegen bakterielle Proteine in der EZD-Aufreinigung oder gegen den 6x His-Tag produzieren, als positiv ausgewählt werden, erfolgte wie bei der Titerbestimmung die Beschichtung der ELISA-Platte nicht mit der EZD des huLT β R, sondern mit rekombinant in Drosophila-S2-Zellen exprimiertem huLT β R-Ig. Außerdem sollten wie bei der Bestimmung des Seruntiters durch die Verwendung eines γ -Ketten-spezifischen Zweitantikörpers nur solche Hybridome ausgewählt werden, die Immunglobuline des Isotyps IgG produzieren. Von diesen konnten nach Subklonierung drei Klone stabil etabliert werden: **4D6**, **8A8** und **13H6** (siehe Abb. 25).

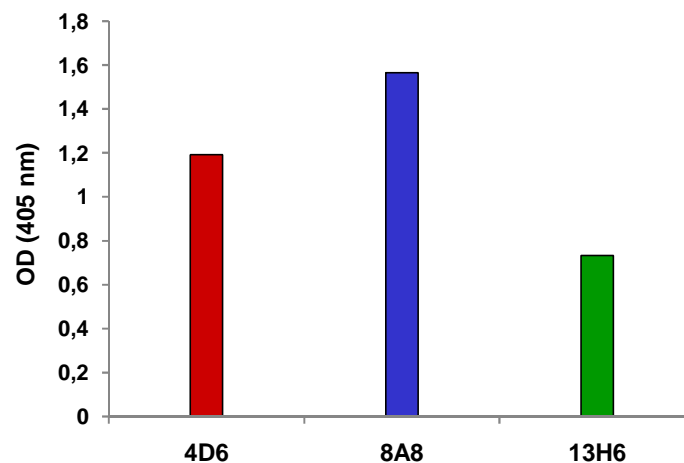


Abb. 25 Die stabil etablierten Hybridome 4D6, 8A8 und 13H6. Diese wurden bei der Fusion aus insgesamt 553 getesteten Klonen ausgewählt. Der Kulturüberstand der Zellen wurde im ELISA eingesetzt. Dabei erfolgte die Beschichtung der Platten mit huLT β R-Ig. Als Sekundärantikörper diente ein anti-Maus IgG γ -Ketten-spezifischer Antikörper.

Bei der Bestimmung der Isotypen (siehe 3.3.8) konnte nachgewiesen werden, dass sowohl 4D6 als auch 8A8 den Isotyp IgG₁ besitzen. 13H6 produzierte jedoch, nachdem er beim Austesten der Hybridome ein positives Signal mit γ -Ketten-spezifischem Zweitantikörper gab, nur noch Antikörper des Isotyps IgM.

Zusätzlich zur Isotypbestimmung wurde getestet, ob die hergestellten Antikörper im ELISA mit mLT β R-Ig (in Drosophila-S2-Zellen exprimiert) ebenfalls kreuzreagieren (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde wie in 3.1.7.2 vorgegangen, nur fand die Beschichtung der ELISA-Platten nicht mit huLT β R-Ig, sondern mit mLT β R-Ig statt. Dabei zeigte sich, dass sowohl

4D6 als auch 8A8 nicht kreuzreaktiv sind. 13H6 war hingegen auch dann positiv, wenn mLT β R-Ig an die Platte gebunden wurde.

4.2.1.6 Reinigung der Antikörper über eine Protein-G-Sepharose-Säule

Zur Herstellung größerer Mengen an gereinigten Antikörpern wurden bei den Hybridomen 4D6 und 8A8 jeweils ungefähr zwei Liter des Kulturüberstandes gesammelt und über eine Protein-G-Sepharose-Säule gegeben (siehe 3.3.7). Die Analyse der Fraktionen aus den Elutionen erfolgte mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und einer Coomassie-Färbung. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass sowohl 4D6 als auch 8A8 nach der Elution in hoher Reinheit vorlagen (siehe Abb. 26). Der größte Teil der Antikörper war in den Fraktionen 2 und 3 zu finden. Im Gel sind zwei Banden zu sehen: die obere bei ca. 60 kDa stellt die schwere Kette, die untere bei ungefähr 25 kDa die leichte Kette der Antikörper dar.

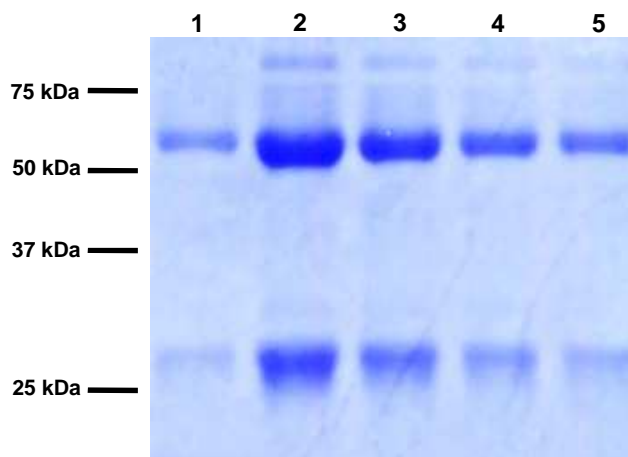


Abb. 26 Analyse der Reinigung monoklonaler anti-huLT β R Antikörper. Der Kulturüberstand der Hybridome wurde gesammelt und über eine Protein-G-Sepharosesäule gereinigt (siehe 3.3.7). Anschließend erfolgte die Analyse der einzelnen Elutionsfraktionen (1-5) mittels eines SDS-Gels. Hier ist exemplarisch die Aufreinigung des Antikörpers 4D6 gezeigt.

Das Hybridom 13H6 kann als IgM-Isotyp nicht über eine Protein-G-Sepharose-Säule gereinigt werden, so dass für die weiteren Versuche sterilfiltrierter Kulturüberstand verwendet wurde.

4.2.1.7 Test der Antikörper im Dot Blot

Die hergestellten Antikörper wurden zunächst im Dot Blot ausgetestet. Dabei trägt man das native Antigen auf eine Nitrozellulosemembran auf, lässt die Proteinlösung eintrocknen und verfährt anschließend wie bei einem Western Blot (siehe 3.1.6.9). Mit Hilfe des Dot Blots

wurde die Reaktivität der Antikörper gegenüber der EZD des huLT β R (aus *E. coli*) und S2-exprimiertem huLT β R-Ig und die Kreuzreaktivität mit mLT β R-Ig überprüft.

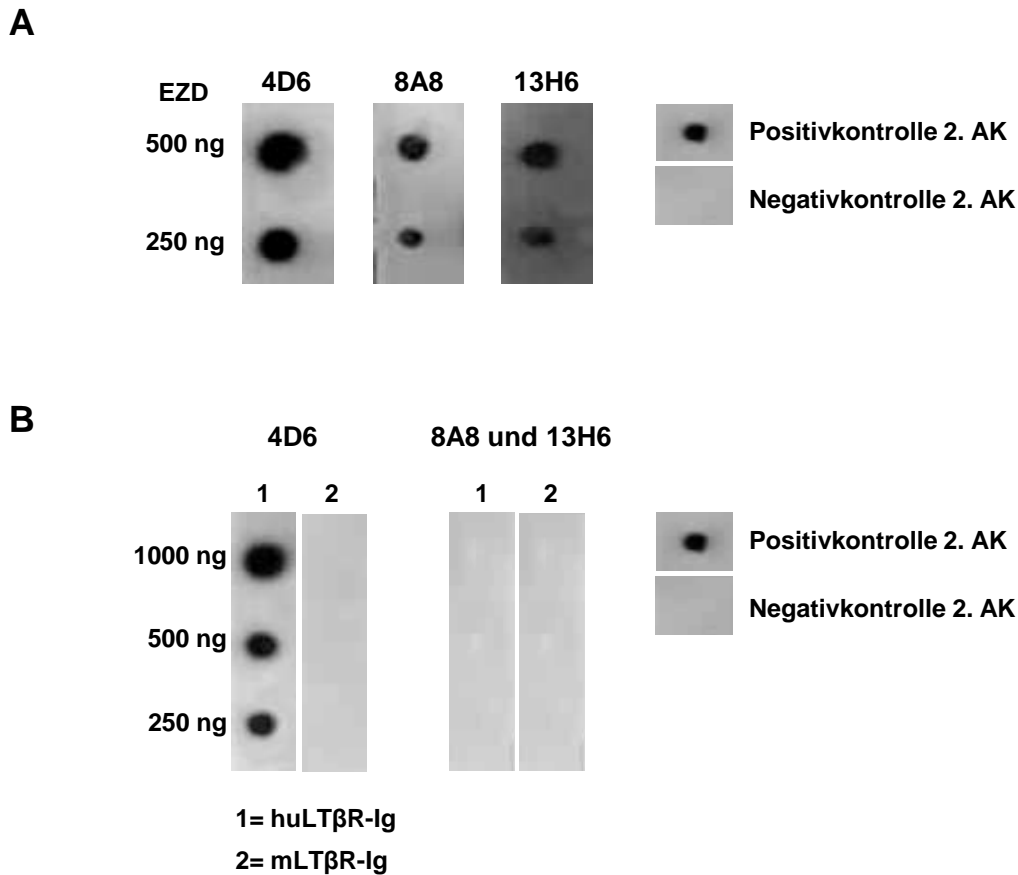


Abb. 27 Detektion von huLT β R (EZD oder Ig-Protein) durch monoklonale anti-huLT β R Antikörper im Dot Blot. **A.** Auf die Nitrozellulosemembran wurden jeweils 500 ng und 250 ng der EZD des huLT β R (in *E. coli* exprimiert) aufgebracht. **B.** Auf die Nitrozellulosemembran wurden jeweils 1000 ng, 500 ng und 250 ng von huLT β R-Ig (1) oder mLT β R-Ig (2) aufgebracht. Die Membranen (A und B) wurden nach dem Trocknen der Proteinlösung mit den angegebenen anti-huLT β R mAK inkubiert. Als Sekundärantikörper diente anti-Maus-IgG-POX (1:1000). Positivkontrolle 2.AK: Auftragung von Mausserum (1:1000), kein Erstantikörper, aber Sekundärantikörper. Negativkontrolle 2.AK: Auftragung von EZD huLT β R, huLT β R-Ig oder mLT β R-Ig, kein Erstantikörper, aber Sekundärantikörper.

In der obigen Abbildung ist zu sehen, dass mit allen drei Antikörpern ein Signal vorhanden ist, wenn die EZD des huLT β R auf die Membran aufgebracht wurde (siehe Abb. 27, A). 4D6 reagiert mit huLT β R-Ig, zeigt aber keine Kreuzreaktivität gegenüber mLT β R-Ig. 8A8 und 13H6 reagieren weder mit huLT β R-Ig noch mit mLT β R-Ig (siehe Abb. 27, B).

4.2.1.8 Test der Antikörper im Western Blot

Neben der Analyse der Antikörper im Dot Blot sollte auch ihre Reaktivität im Western Blot überprüft werden. Dazu erfolgte zunächst eine Auftrennung der Antigene auf einem SDS-Gel. Dadurch liegen die Proteine nicht wie beim Dot Blot im nativen, sondern im denaturierten Zustand vor.

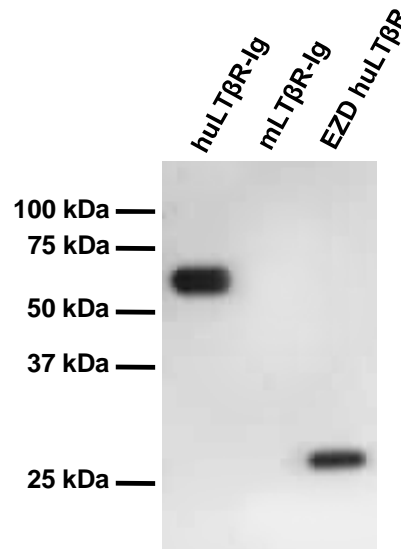


Abb. 28 Detektion von huLTβR (EZD oder Ig-Protein) mittels des anti-huLTβR mAK 8A8 im Western Blot. Die rekombinanten Proteine huLTβR-Ig, mLTβR-Ig und EZD huLTβR wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Im anschließenden Western Blot diente der anti-huLTβR mAK 8A8 (c= 10 µg/ml) als Erstantikörper. Als Zweitantikörper wurde anti-Maus-IgG-POX verwendet (1:1000).

Im Western Blot zeigt der Antikörper 4D6 keine Bindung an die EZD des huLTβR, an huLTβR-Ig oder an mLTβR-Ig (Daten nicht gezeigt). 13H6 bindet an huLTβR-Ig und ist auch kreuzreaktiv gegenüber mLTβR-Ig (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe von 8A8 kann man huLTβR-Ig und die EZD des huLTβR, nicht jedoch mLTβR-Ig, im Western Blot nachweisen (siehe Abb. 28).

4.2.1.9 Test der Antikörper im Durchflusszytometer

Als nächstes wurden die hergestellten anti-huLTβR Antikörper daraufhin überprüft, ob sie für die Färbung von Zellen zur Analyse im Durchflusszytometer geeignet sind. Dazu wurden A375-Zellen, eine humane Melanomzelllinie, von der bekannt ist, dass sie den LTβR exprimiert (Degli-Esposti et al., 1997), jeweils mit den drei Antikörpern inkubiert. Als Zweitantikörper kam ein anti-Maus IgG („whole molecule“), der FITC-konjugiert ist, zum Einsatz. Die gereinigten Immunglobuline 4D6 und 8A8 wurden in unterschiedlichen Mengen von 5 µg, 10 µg und 20 µg mit den Zellen inkubiert. Bei keiner der Färbungen konnte ein

Signal detektiert werden (siehe Abb. 29, untere Reihe, gezeigt ist die Färbung mit 10 μ g Antikörper). Beim Hybridom 13H6 wurde wie schon erwähnt der Kulturüberstand (100 μ l) auf die A375-Zellen pipettiert. Hier zeigte sich eine Rechtsverschiebung der Zellpopulation im Durchflusszytometer (siehe Abb. 29, untere Reihe, rechts), so dass man davon ausgehen kann, dass 13H6 für die FACS-Analyse geeignet ist. Das Signal, das man mit 13H6 erhält, ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie es bei der Positivkontrolle, einem seit Ende 2007 käuflich erhältlichen anti-huLT β R Antikörper (Klon 31G4D8), der Fall ist (siehe Abb. 29, obere Reihe, rechts).

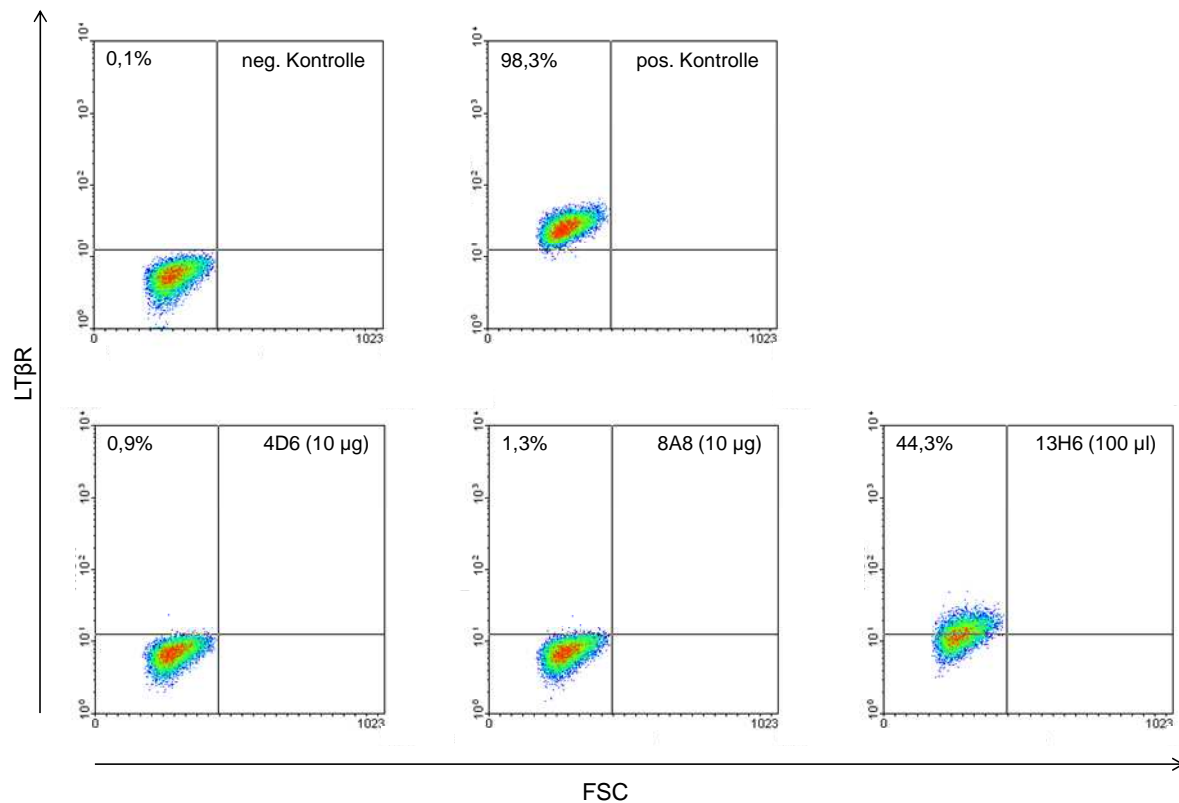


Abb. 29 FACS-Analyse mit den etablierten Hybridomen 4D6, 8A8 und 13H6. A375-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an Antikörpern versetzt. Als Zweitantikörper diente ein anti-Maus-IgG FITC-konjugierter Antikörper. In der oberen Reihe sind die Negativkontrolle (nur Zweitantikörper) und die Positivkontrolle (anti-huLT β R mAK, Klon 31G4D8) aufgetragen. In der unteren Reihe sieht man die FACS-Analysen mit 4D6, 8A8 und 13H6. Gezeigt ist hier jeweils die Färbung mit 10 μ g gereinigtem Antikörper bzw. 100 μ l sterilfiltriertem Hybridomüberstand. FSC= Forward Scatter.

4.2.1.10 *Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen für die funktionelle Analyse der anti-huLT β R Antikörper 4D6 und 8A8*

Als Testsystem für die funktionelle Analyse der Klone 4D6 und 8A8 wurde die humane Melanomzelllinie A375 ausgewählt, da bereits bekannt ist, dass ihre Stimulation mit LT α LT β -Oligomeren (Degli-Esposti et al., 1997) und mit rekombinantem huLIGHT

(rhuLIGHT) (Hehlhans et al., 2001) zu einer Induktion der Expression von Interleukin-8 führt. Diese ist außerdem von einer Aktivierung des NF κ B-Signalwegs abhängig (Chang et al., 2002). Zur Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen wurden die A375-Zellen zunächst mit rhuLIGHT (in unserem Labor hergestellt) und mit dem bereits erwähnten anti-huLT β R Antikörper (Klon 31G4D8) stimuliert. Dies ist ein monoklonaler Antikörper, der aus einer mit einem huLT β R Fc-Protein immunisierten Maus generiert wurde und für FACS-Analysen und Immunpräzipitationen verwendet werden kann. Außerdem ist er unter bestimmten Versuchsbedingungen agonistisch (Chen et al., 2003).

In den Vorexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass der anti-huLT β R Antikörper genauso wie rhuLIGHT in den A375-Zellen zu einer Induktion der IL-8-Expression und zu einer Aktivierung des NF κ B-Signalwegs führt (siehe Abb. 30). Somit ist er auch unter Verwendung der A375-Zellen agonistisch.

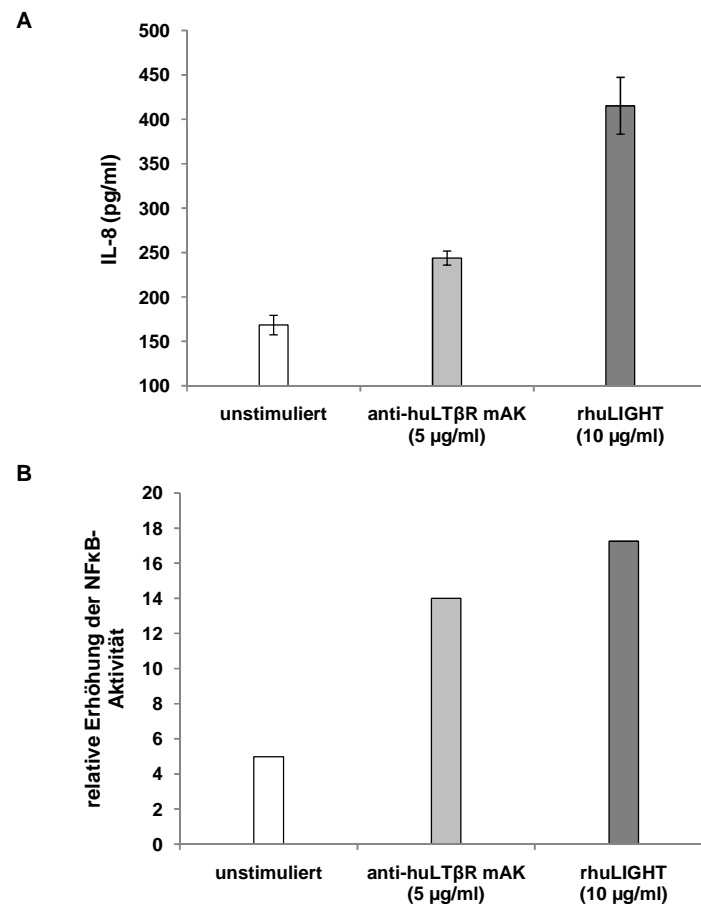


Abb. 30 Die Stimulation von A375-Zellen mit agonistischem anti-huLT β R mAK (Klon 31G4D8) und rhuLIGHT. **A.** Die IL-8-Expression der A375 nach Stimulation des LT β R. Dafür wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten in Triplikaten ausgesät und nach einem Tag für 2 h mit 5 μ g/ml anti-huLT β R mAK und als Positivkontrolle mit 10 μ g/ml rhuLIGHT inkubiert oder unstimuliert belassen (Negativkontrolle). Aus dem Kulturüberstand wurde mittels eines ELISAs die IL-8-Konzentration bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei

Experimenten. **B.** Die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs in den A375 nach Stimulation des LT β R dargestellt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät und nach 24 h mit phRL-TK und pGL2-NF κ B (Verhältnis: 1:15) unter Verwendung von DOTAP kotransfiziert. Nach ca. 18 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 2 h stimuliert (siehe oben). Die Lysate wurden mit Hilfe eines Luminometers analysiert. Die Werte wurden anhand der Renilla-Luciferaseaktivität normalisiert. Dargestellt ist eines von zwei übereinstimmenden Experimenten.

Bei den Vorversuchen zeigte sich außerdem, dass bereits bei einer Stimulationsdauer von 2 h mit dem agonistischen anti-huLT β R mAK (Klon 31G4D8) und rhuLIGHT ein Konzentrationsanstieg von IL-8 im Kulturüberstand der stimulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen zu sehen ist (siehe Abb. 30). Bei einer längeren Stimulierung der Zellen (4 h, 8 h oder 24 h) kommt es hingegen nicht zu einer stärkeren Induktion der IL-8-Expression, da die A375-Zellen endogen IL-8 exprimieren (Daten nicht gezeigt). Weiterhin erwies sich eine Konzentration von 5 μ g/ml beim agonistischen anti-huLT β R Antikörper und eine Konzentration von 10 μ g/ml beim rhuLIGHT als ideal für die Stimulierungen (siehe Abb. 30). Eine erhöhte oder erniedrigte Gabe der Stimulanzen brachte keine zusätzliche Erhöhung der IL-8-Expression bzw. der NF κ B-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Somit wurde für die weiteren Versuche zur Austestung der agonistischen oder antagonistischen Wirkung der anti-huLT β R Antikörper 4D6 und 8A8 die Stimulationsdauer auf 2 h festgelegt. Die Konzentration der hergestellten Antikörper wurde bei den verschiedenen Versuchen variiert. Nur die Positivkontrollen wurden wie oben ermittelt eingesetzt. Der Antikörper 13H6 wurde aufgrund des IgM-Isotyps nicht bei den funktionellen Tests untersucht.

4.2.1.11 *Analyse der agonistischen Wirkung der Antikörper 4D6 und 8A8*

Zunächst wurde die agonistische Wirkung der beiden anti-huLT β R mAK 4D6 und 8A8 im Hinblick auf die Induktion der IL-8-Expression und die Erhöhung der NF κ B-Aktivität untersucht.

4.2.1.11.1 Induktion der IL-8-Expression

Für die Stimulationsversuche wurden A375 in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät. Nach einem Tag erfolgte die Zugabe der zu testenden Antikörper 4D6 und 8A8. Beide Antikörper wurden in den Konzentrationen 5 μ g/ml, 10 μ g/ml und 20 μ g/ml bei den Stimulationsversuchen verwendet und für 2 h auf den Zellen belassen. Die Bestimmung der IL-8-Expression wurde mittels eines ELISAs durchgeführt.

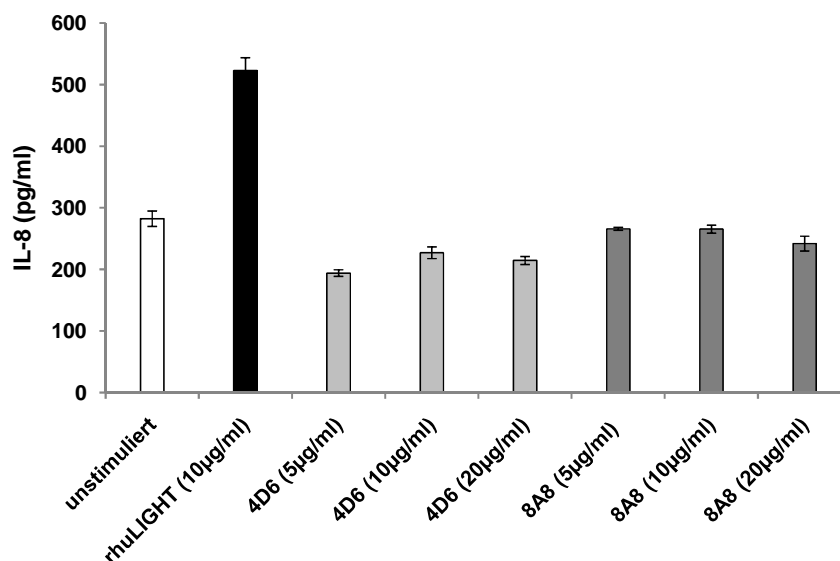


Abb. 31 Die IL-8-Expression der A375-Zellen nach Stimulation mit 4D6 und 8A8. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten in Triplikaten ausgesät und nach 24 h im Brutschrank für 2 h mit 4D6 und 8A8 in einer Konzentration von 5, 10 und 20 µg/ml stimuliert. Als Positivkontrolle diente rhuLIGHT ($c=10 \mu\text{g/ml}$). Die Negativkontrolle sind unstimulierte Zellen. Die IL-8-Konzentration wurde im Kulturüberstand mittels eines ELISAs bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Dargestellt ist eines von zwei Experimenten.

Wie in Abb. 31 zu sehen ist, führte keiner der beiden anti-huLT β R mAK 4D6 und 8A8 in den unterschiedlichen Konzentrationen zu einer Stimulation der IL-8-Expression.

4.2.1.11.2 Stimulation des NF κ B-Signalwegs

Als weiterer Parameter zur Überprüfung der möglichen agonistischen Wirkung der monoklonalen Antikörper wurde die Aktivierung des NF κ B-Signalweges untersucht. Dabei wurde wie in 3.2.12 beschrieben vorgegangen. Es zeigte sich, dass sowohl die Zugabe von 4D6 als auch von 8A8 zu keiner Aktivierung des NF κ B-Signalwegs führt (siehe Abb. 32). Mit der Positivkontrolle rhuLIGHT ($c=10 \mu\text{g/ml}$) ist hingegen eine deutliche Induktion der Reportergenaktivität zu beobachten.

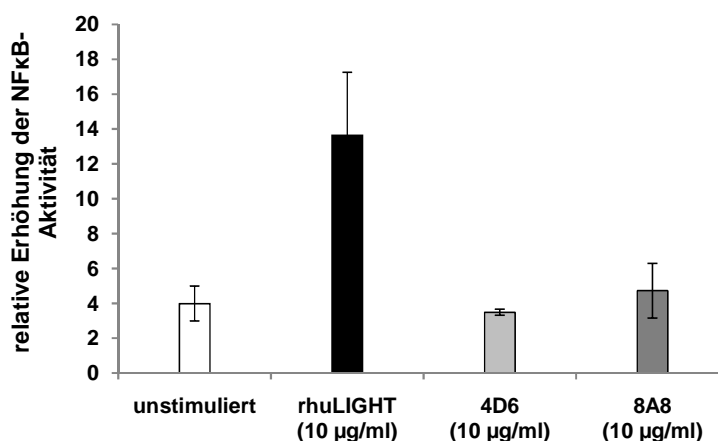


Abb. 32 Aktivierung des NF κ B-Signalwegs in A375 nach Inkubation mit 4D6 und 8A8. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät, nach 24 h mit phRL-TK und pGL2-NF κ B kotransfiziert (ca. 18 h) und für 4 h stimuliert. Die Lysate wurden in einem Luminometer analysiert. Die Werte wurden mittels der Renilla-Luciferase normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4.2.1.12 Analyse der antagonistischen Wirkung der Antikörper 4D6 und 8A8

Nachdem keiner der beiden Antikörper 4D6 und 8A8 agonistisch ist, wurde ebenfalls mit den A375-Zellen untersucht, ob eine antagonistische Wirkung vorliegen könnte.

4.2.1.12.1 Blockade der IL-8-Expression

Um zu überprüfen, ob die Stimulation der IL-8-Expression durch die Zugabe der hergestellten Antikörper 4D6 und 8A8 gehemmt werden kann, wurden wiederum A375-Zellen verwendet (siehe 3.2.6). Die Antikörper 4D6 und 8A8 wurden im Verhältnis 1:1, 5:1 und 10:1 zum rekombinanten huLIGHT eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der Überstand von Zellen, die für 2 h ohne Stimulus belassen und anschließend mit rhuLIGHT für 2 h behandelt wurden. Die Negativkontrolle waren unstimulierte A375-Zellen.

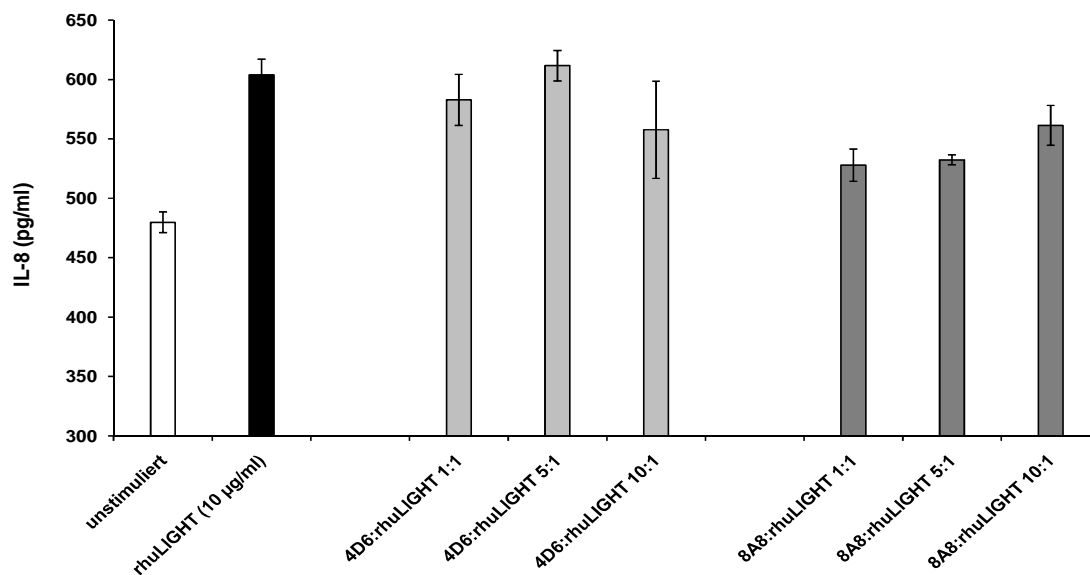


Abb. 33 Die Expression von IL-8 nach Zugabe von 4D6 und 8A8 bei gleichzeitiger Stimulation mit rhuLIGHT. Die A375-Zellen wurden in 24-Well-Platten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in Triplikaten ausgesät und einen Tag im Brutschrank belassen. Danach erfolgte die Zugabe von 4D6 bzw. 8A8 für 2 h und eine weitere Inkubation mit rhuLIGHT ($c = 10 \mu\text{g/ml}$) für 2 h. Das Konzentrationsverhältnis zwischen 4D6 bzw. 8A8 und rhuLIGHT betrug dabei 1:1, 5:1 und 10:1. Die IL-8-Konzentration im Kulturüberstand wurde mittels eines ELISAs bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Wie in Abb. 33 zu sehen ist, zeigte sich durch die Zugabe von 4D6 vor der Stimulation mit rhuLIGHT weder bei 1:1, 5:1 noch bei 10:1 eine Verringerung der induzierten IL-8-

Expression. Die Inkubation mit 8A8 und rhuLIGHT im Verhältnis 1:1 und 5:1 führte hingegen zu einer leicht verminderten IL-8-Konzentration im Überstand. Bei höheren Konzentrationen von 8A8 (Verhältnis 10:1) ist dieser Effekt jedoch geringer ausgeprägt. Somit hemmt der hergestellte anti-huLT β R Antikörper 8A8 die durch die Stimulierung des LT β R mit rhuLIGHT erhöhte IL-8-Expression und scheint antagonistische Wirkung aufzuweisen.

Um diesen Befund weiter zu untersuchen, wurde anstatt des rhuLIGHT auch der agonistische anti-huLT β R mAK 31D4G8 ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) verwendet und im Verhältnis 1:1, 1:5 und 1:10 mit 8A8 im Versuch eingesetzt. Auch hier konnte bis auf den Ansatz mit einem zehnfachen Überschuss an 8A8 eine Hemmung der Stimulation der IL-8-Expression beobachtet werden (siehe Abb. 34).

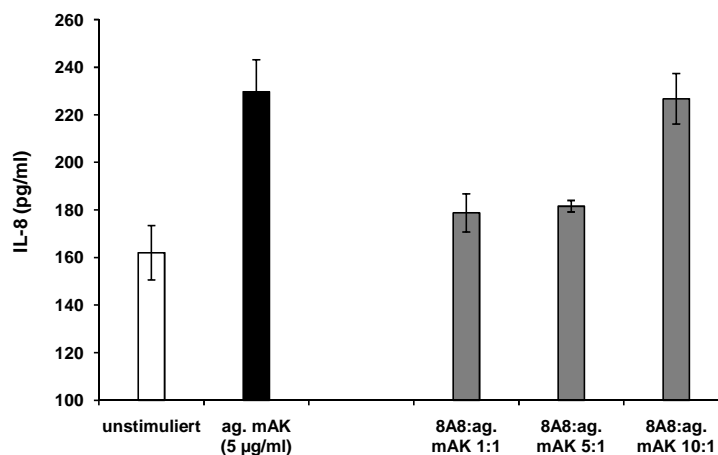


Abb. 34 Expression von IL-8 bei Zugabe von 8A8 und agonistischem mAK 31G4D8. A375-Zellen wurden in 24-Well-Platten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in Triplikaten ausgesät und nach einem Tag für 2 h mit 8A8 inkubiert. Danach erfolgte die Stimulation mit $5 \mu\text{g/ml}$ agonistischem anti-huLT β R mAK. 8A8 wurde dabei im Verhältnis 1:1, 5:1 und 10:1 zum 31G4D8 eingesetzt. Die Konzentration an IL-8 wurde aus dem Kulturüberstand mittels eines ELISAs bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Somit scheint der anti-huLT β R mAK 8A8 in Bezug auf die Hemmung der Induktion der IL-8-Expression antagonistisch zu sein.

4.2.1.12.2 Hemmung der NF κ B-Aktivierung

Da 8A8 in den vorhergehenden Versuchen (siehe 4.2.1.12.1) die Induktion der IL-8-Expression vermindern konnte, sollte auch die Hemmung der NF κ B-Aktivierung untersucht werden. Dazu wurden die Zellen zunächst wie in 4.2.1.11.2 behandelt, dann mit rhuLIGHT für 2 h und schließlich mit 8A8 im Verhältnis 1:1 und 1:5 für weitere 2 h inkubiert. Zusätzlich dazu wurde auf die gleiche Weise auch die Wirkung von 4D6 überprüft. Als Negativkontrolle

dienten unstimulierte Zellen. Für die Positivkontrolle wurden die A375-Zellen nur mit rhuLIGHT behandelt. Bei der Analyse der Zelllysate mittels eines Luminometers zeigte sich, dass die Zugabe von 8A8 in der äquivalenten Konzentration oder im fünffachen Überschuss, nicht aber von 4D6, zu einer Verminderung der NFκB-Aktivität führt (siehe Abb. 35). Somit scheint der anti-huLTβR mAK 8A8 eine antagonistische Wirkung zu besitzen, wenn er in der richtigen Konzentration eingesetzt wird.

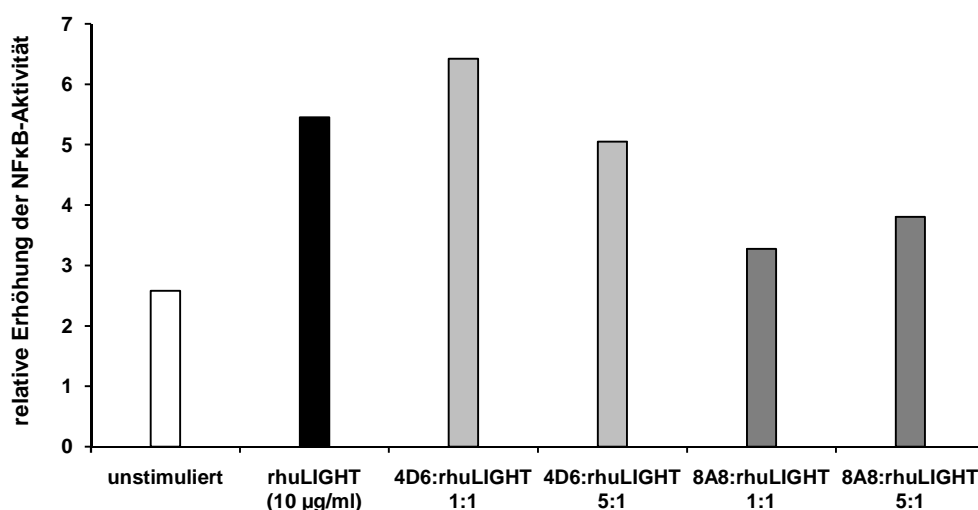


Abb. 35 Aktivierung des NFκB-Signalweges nach Zugabe von 4D6 bzw. 8A8 und rhuLIGHT. A375-Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank belassen. Danach erfolgte die transiente Kotransfektion mit phRL-TK und pGL2-NFκB (ca. 18 h). Die Zellen wurden zunächst mit 4D6 oder 8A8 für 2 h und anschließend mit rhuLIGHT ($c = 10 \mu\text{g/ml}$, im Verhältnis 1:1 und 5:1) für weitere 2 h inkubiert. Die Lysate wurden in einem Luminometer analysiert. Dargestellt ist eines von zwei übereinstimmenden Experimenten.

4.2.1.13 Zusammenfassung der Charakterisierung der anti-huLTβR Antikörper

In der folgenden Abbildung sind die Eigenschaften der hergestellten anti-huLTβR Antikörper zusammengefasst (siehe Abb. 36).

Klon	4D6	8A8	13H6
Isotyp	IgG ₁	IgG ₁	IgM
ELISA	+	+	+
Dot Blot	+	-	-
Western Blot	-	+	-
FACS-Analyse	-	-	+
agonistisch	-	-	n.d.
antagonistisch	-	+	n.d.

Abb. 36 Übersicht über die Verwendbarkeit der anti-huLTβR Antikörper. Es ist nur die Reaktivität gegenüber dem humanen LTβR angegeben. Kreuzreaktivitäten sind nicht dargestellt.

4.2.2 Expression des LT β R in humanen Geweben

Bereits vor einiger Zeit wurden in unserem Labor Hybridome durch eine Fusion von Milzzellen einer mit huLT β R immunisierten Ratte mit Sp2/0-Ag14-Zellen generiert. Das im ELISA (Beschichtung mit huLT β R-Ig) positive Hybridom 3G10H3 zeigte im Western Blot keine Reaktivität gegenüber huLT β R-Ig und soll nun dahingehend untersucht werden, ob es für die Färbung von humanen Paraffinschnitten geeignet ist. Dazu wurde der Kulturüberstand des Hybridoms 3G10H3 verwendet, um auf Paraffinschnitten humaner Gewebe (Milz, Kolon- und Ovarialkarzinom) spezifische den huLT β R mit Hilfe eines sekundären anti-Ratten Antikörpers nachzuweisen.

4.2.2.1 Milz

Für die Färbungen wurden zunächst Paraffinschnitte von humanem Milzgewebe angefertigt, welches freundlicherweise vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt wurde. Danach erfolgte die Färbung mit dem Überstand des Hybridoms 3G10H3 (siehe 3.5.2).

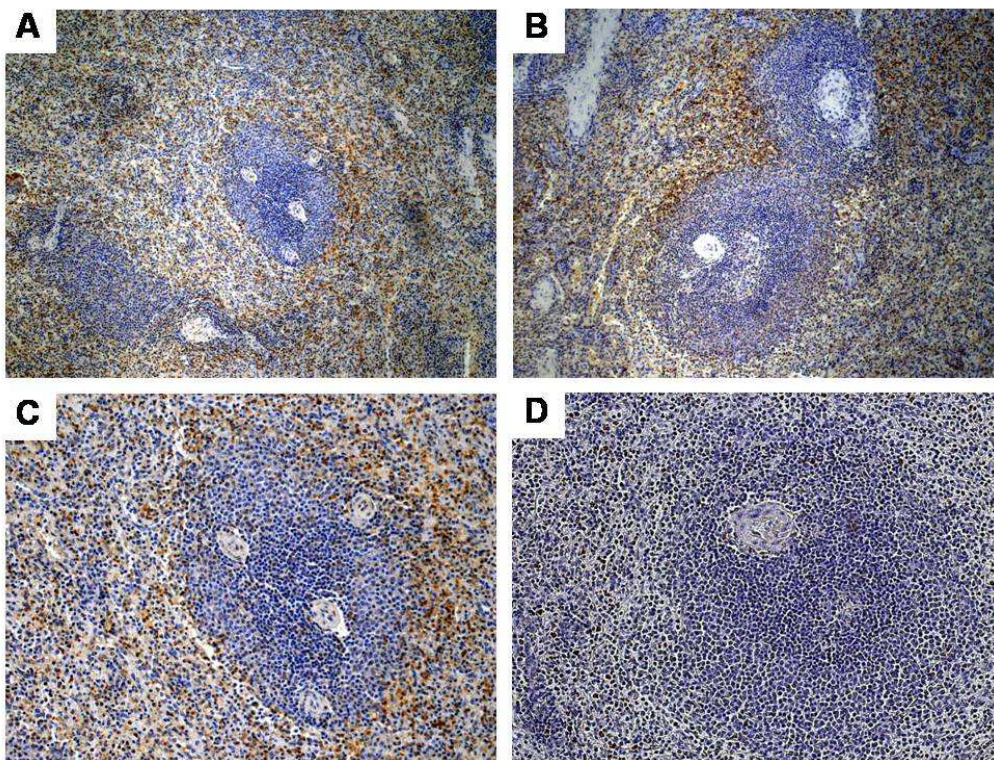


Abb. 37 Nachweis der Expression des LT β R auf humanen Milzschnitten mit dem Antikörper 3G10H3. **A und B:** Färbung des LT β R auf Zellen in der roten Pulpa der Milz (braune Färbung). Die B- und T-Lymphozyten in der weißen Pulpa sind blau angefärbt (Hämalaun). Vergrößerung: 160x. **C:** Färbung der Zellen wie in A und B. Vergrößerung: 250x. **D:** Isotypkontrolle: kein Erstantikörper, sondern Ratten-IgG, ansonsten gleiche Behandlung der Gewebeschnitte wie in A, B und C. Vergrößerung: 250x.

Die immunhistochemischen Schnitte zeigen, dass mit dem Antikörper des Hybridoms 3G10H3 die rote Pulpa der Milz angefärbt werden kann (braune Färbung, siehe Abb. 37). Diese besteht hauptsächlich aus Stroma und für den Abbau von alten Erythrozyten zuständigen Makrophagen. Die weiße Pulpa, welche B- und T-Lymphozyten beinhaltet, lässt sich hingegen nicht anfärben (blaue Hämalaunfärbung, siehe Abb. 37). Da der LT β R auf B- und T-Lymphozyten nicht exprimiert wird, alle anderen Zellen des Organismus ihn zum großen Teil jedoch tragen, kann man davon ausgehen, dass der Antikörper des Hybridoms 3G10H3 für die spezifische Färbung des LT β R in Paraffinschnitten geeignet ist.

4.2.2.2 Kolon- und Ovarialkarzinom

Für die Färbung von Tumormaterial wurden Paraffinschnitte aus Kolon- und Ovarialkarzinommaterial hergestellt, das ebenfalls vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg stammte. Das Färbeprotokoll wurde wie in 3.5.2 beschrieben durchgeführt.

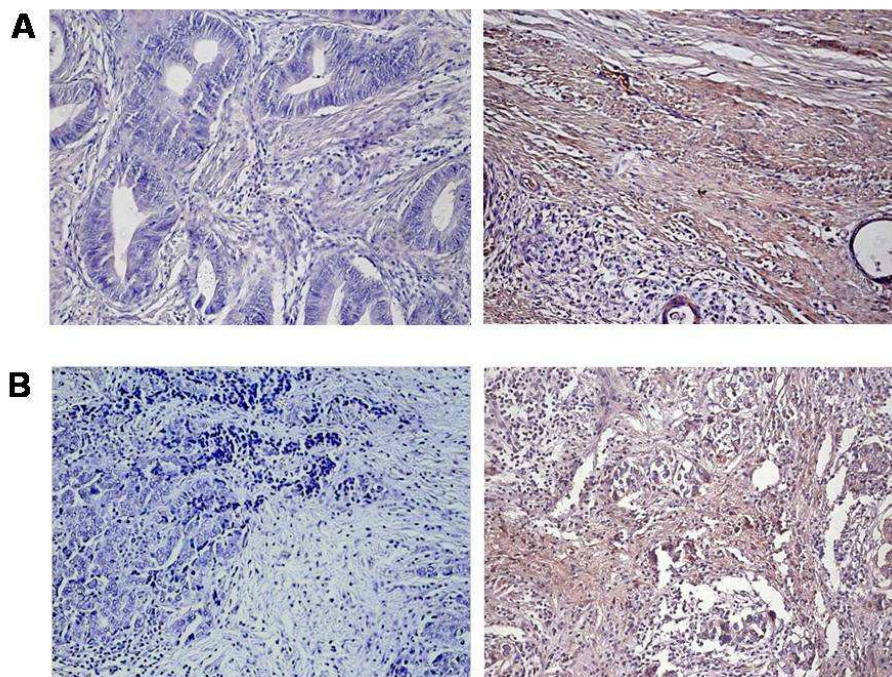


Abb. 38 Nachweis der Expression des LT β R in humanen Kolon- und Ovarialkarzinomen mit dem Antikörper 3G10H3. **A:** Kolonkarzinom. Auf der linken Seite sieht man die Isotypkontrolle (ohne Erstantikörper, mit Ratten-IgG), auf der rechten Seite die Färbung des LT β R (in braun). **B:** Ovarialkarzinom. Auf der linken Seite ist wiederum die Isotypkontrolle (wie in A), auf der rechten Seite die Färbung des LT β R (in braun). In beiden Fällen sind die Schnitte zusätzlich noch mit Hämalaun angefärbt (blau). Vergrößerung: 250x.

Sowohl die Kolon- als auch die Ovarialkarzinome können mit dem Antikörper des Hybridoms 3G10H3 angefärbt werden. Der LT β R ist in beiden Tumorarten stark exprimiert (braune Färbung, siehe Abb. 38, A und B, jeweils rechte Seite). Außerdem sind deutlich die in den

Tumor eingewanderten Lymphozyten zu erkennen, welche wie zu erwarten negativ für den LT β R sind (blaue Hämalanfärbung, siehe Abb. 38).

4.2.3 Stimulation von humanem Tumormaterial mit rhuLIGHT und agonistischem anti-huLT β R Antikörper

Für die folgenden Versuche wurde frisches, operativ entferntes humanes Tumormaterial verwendet, das wie schon die humanen in Paraffin eingebetteten Gewebe vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt wurde. Kolon- und Ovarialkarzinome wurden von den Pathologinnen Dr. Frauke Bataille, Dr. Simone Bertz, Katharina Schardt und Dr. Corinna Vogel im Schnellschnitt untersucht und sofort im Anschluss in die Stimulationsexperimente eingesetzt. Zusätzlich dazu wurde ein Stück des Tumorgewebes für weitere Analysen in RNAlater eingefroren.

4.2.3.1 Nachweis der Expression von LT β R und HVEM im Kolon- und Ovarialkarzinomgewebe

Aus den erhaltenen, unbehandelten Kolon- und Ovarialkarzinomen wurde RNA isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Expression des LT β R und von HVEM soll somit in allen untersuchten Tumorentitäten nachgewiesen werden.

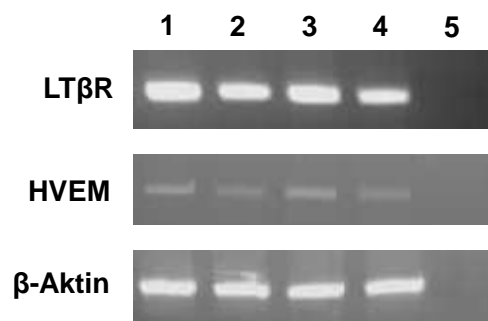


Abb. 39 Nachweis des LT β R und von HVEM im Kolon- und Ovarialkarzinomgewebe. Aus den angegebenen Geweben wurde RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Mittels RT-PCR erfolgte der Nachweis des LT β R und von HVEM. Als Kontrolle wurde β -Aktin verwendet. 1+2: Kolonkarzinomgewebe, 3+4: Ovarialkarzinomgewebe, 5: Negativkontrolle ohne cDNA.

Im Gelbild (siehe Abb. 39) sind exemplarisch jeweils zwei der untersuchten Kolon- und Ovarialkarzinome gezeigt. In beiden Geweben ist der LT β R und zu einem geringeren Anteil auch HVEM exprimiert.

4.2.3.2 Stimulation von primären Kolonkarzinomgeweben

Insgesamt standen für die Stimulationsversuche drei verschiedene Kolonkarzinome zur Verfügung. Diese wurden jeweils in Stücke geschnitten, wobei die Anzahl abhängig von der Größe des Tumorgewebes war, gewogen und für 2 h bei 37°C in Medium inkubiert (siehe 3.2.8). Im Kulturüberstand wurde die Konzentration an gebildetem IL-8 bestimmt. Das stimulierte Gewebe wurde für die Bestimmung von IL-8 mittels quantitativer PCR verwendet.

4.2.3.2.1 Nachweis von IL-8 auf mRNA-Ebene

Um zu untersuchen, ob die Zugabe von rhuLIGHT oder anti-huLTβR mAK 31G4D8 im Primärgewebe die Transkription von IL-8-mRNA erhöht, wurde eine quantitative PCR durchgeführt (siehe 3.1.5.4). Dabei wurden zwei der drei Kolonkarzinomgewebe analysiert. Zunächst erfolgte die Überprüfung der Qualität der RNA mittels eines Northern Blots. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die RNA nicht degradiert war (Daten nicht gezeigt) und für eine quantitative PCR verwendet werden konnte.

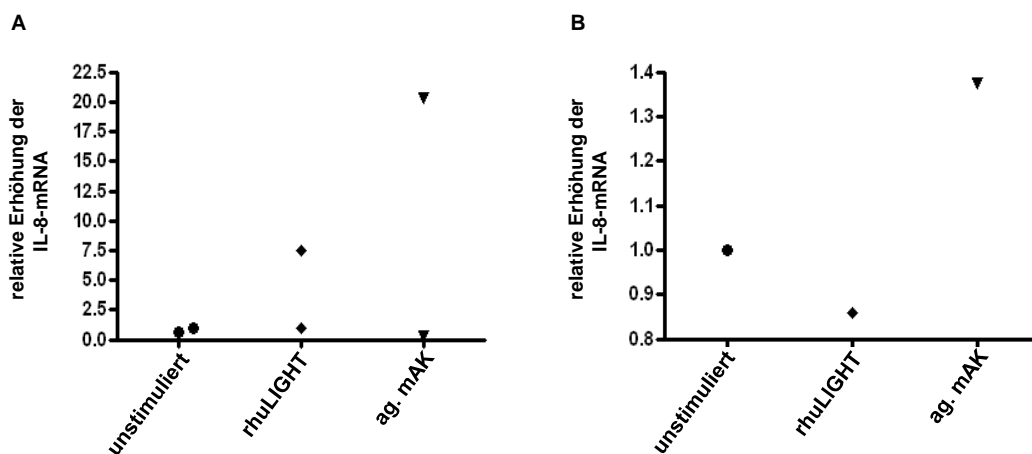


Abb. 40 Quantitative PCR zum Nachweis von IL-8 in Kolonkarzinomgeweben. Die Tumorproben wurden sofort nach Erhalt in kleine Stücke geschnitten, gewogen und für 2 h in Kultur genommen (siehe 3.2.8). Die Anzahl der Gewebestücke richtete sich nach der Größe der erhaltenen Tumorproben. Nach der Stimulierung wurde aus den Geweben RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte der Nachweis der IL-8 mRNA mittels quantitativer PCR. Als Referenzgen diente 18S. Der Wert eines unstimulierten Gewebes wurde 1 gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Angegeben sind die Einzelwerte der stimulierten Gewebe. **A:** Tumor 1, **B:** Tumor 2.

Die Ergebnisse der quantitativen PCR sind sehr inhomogen (siehe Abb. 40). Im Primärgewebe aus Tumor 1 (siehe Abb. 40, A) war nur wenig IL-8-mRNA in den unstimulierten Tumorstücken zu detektieren. Nach der Stimulierung mit rhuLIGHT und mit dem agonistischen anti-huLTβR mAK war die IL-8-Expression nur jeweils in einer der untersuchten Gewebeproben erhöht. Das andere Tumorstück blieb auf dem Niveau der

unstimulierten Kontrollen. Beim Primärgewebe aus Kolonkarzinom 2, das sehr klein war, führte die Stimulierung zu keiner Erhöhung der IL-8-mRNA im Vergleich zum unbehandelten Tumorgewebe (siehe Abb. 40, B). Es muss jedoch festgestellt werden, dass die Anzahl der untersuchten Tumorgewebe zu gering war, um Rückschlüsse zu erhalten, ob das erhaltene Ergebnis repräsentativ ist.

4.2.3.2.2 Nachweis von IL-8 auf Proteinebene

Die Analysen zur Konzentrationsbestimmung von IL-8 im Kulturüberstand wiesen wie schon bei der Bestimmung durch quantitative PCR eine große Streuung auf (siehe Abb. 41). Die Expression von IL-8 ist im unstimulierten Kolonkarzinomgewebe 1 relativ gering. Durch die Inkubation mit rhuLIGHT ($c = 10 \mu\text{g/ml}$) ist in beiden Proben eine Zunahme der IL-8-Konzentration zu beobachten. Die Zugabe von agonistischem anti-huLT β R mAK 31G4D8 ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) führt hingegen nur in einem der beiden Tumorgewebe zu einer erhöhten IL-8-Expression. Das erhaltene Kolonkarzinomgewebe 2 war sehr klein, so dass nur jeweils ein Tumorstück untersucht werden konnte. Dabei ändert sich die IL-8-Konzentration durch die Stimulation mit rhuLIGHT oder mit anti-huLT β R mAK 31G4D8 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nicht. Das letzte untersuchte Tumorgewebe (Kolonkarzinom 3) exprimiert von sich aus große Mengen an IL-8. Diese konnte durch die Zugabe von rhuLIGHT oder agonistischem anti-huLT β R mAK nicht erhöht werden.

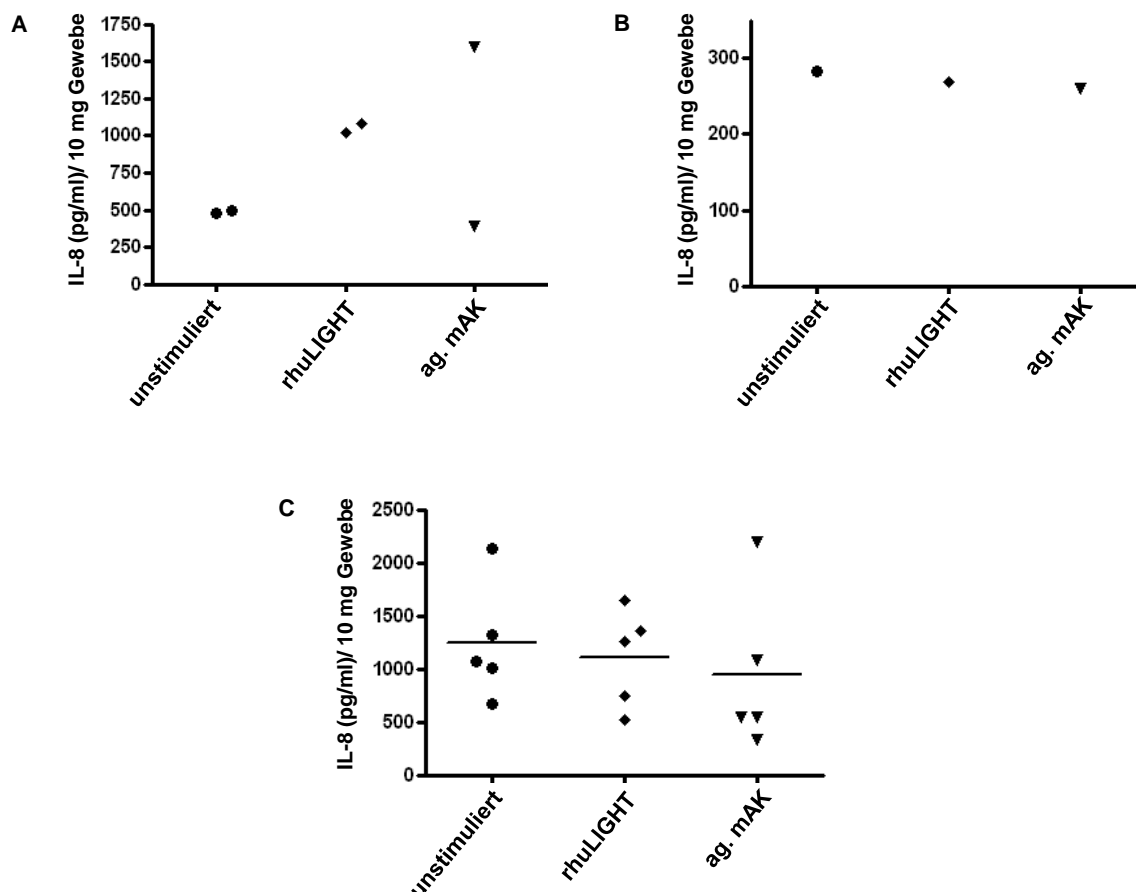


Abb. 41 IL-8-Expression der Kolonkarzinomgewebe. Die Tumorproben wurden sofort nach Erhalt in kleine Stücke geschnitten, gewogen und für 2 h in Kultur genommen. Die Anzahl der Gewebestücke richtete sich nach der Größe der erhaltenen Tumorproben. Es erfolgte entweder eine Stimulation mit rhuLIGHT ($c= 10 \mu\text{g/ml}$) oder mit agonistischem anti-huLT β R mAK ($c= 5 \mu\text{g/ml}$) oder die Tumore wurden unbehandelt belassen. Aus dem Kulturüberstand wurde die IL-8-Konzentration mittels eines ELISAs bestimmt. Die Werte wurden auf 10 mg Tumorgewebe umgerechnet. **A:** Tumor 1, **B:** Tumor 2, **C:** Tumor 3.

Insgesamt war zu wenig primäres Tumormaterial vorhanden, um eine klare Aussage über die mögliche Zunahme der IL-8-Expression durch die Stimulation des Primärgewebes zu treffen.

4.2.3.3 Stimulation von primären Ovarialkarzinomgeweben

Für die Stimationsversuche standen vier verschiedene primäre Ovarialkarzinomgewebe zur Verfügung. Diese wurden wie in 4.2.3.2 behandelt und analysiert.

4.2.3.3.1 Nachweis von IL-8 auf mRNA-Ebene

Für die Analyse der Menge an IL-8-mRNA wurden zwei Ovarialkarzinomgewebe (1 und 2) verwendet, bei denen größere Proben vorhanden waren. Wie bei den Kolonkarzinomgeweben zeigte sich auch hier eine große Streuung der Ergebnisse (siehe Abb. 42), so dass keine

Aussagen über die Stimulierbarkeit des primären Ovarialkarzinomgewebes mit rhuLIGHT oder anti-huLT β R mAK getroffen werden können.

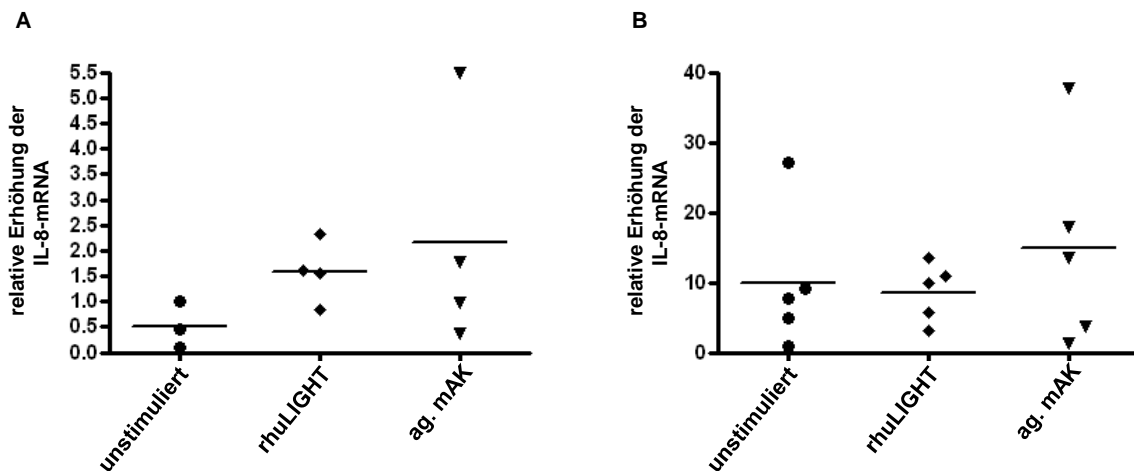


Abb. 42 Quantitative PCR für IL-8 in Ovarialkarzinomgeweben. Die Tumorproben wurden sofort nach Erhalt in kleine Stücke geschnitten, gewogen und für 2 h in Kultur genommen (siehe 3.2.8). Die Anzahl der Gewebestücke richtete sich nach der Größe der erhaltenen Tumorproben. Nach der Stimulierung wurde aus den Geweben RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte der Nachweis der IL-8 mRNA mittels quantitativer PCR. Als Referenzgen diente 18S. Der Wert eines unstimulierten Gewebes wurde 1 gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Angegeben sind die Einzelwerte der stimulierten Gewebe. **A:** Tumor 1, **B:** Tumor 2.

4.2.3.3.2 Nachweis von IL-8 auf Proteinebene

Ebenso wie die Kolonkarzinomgewebe wiesen die Ovarialkarzinomgewebe bei der Expression von IL-8 eine große Inhomogenität auf (siehe Abb. 43). Das Ovarialkarzinomgewebe 1 exprimierte relativ geringe Mengen des Chemokins. Außerdem gibt es keine Unterschiede zwischen den unstimulierten und den mit rhuLIGHT oder agonistischem anti-huLT β R mAK behandelten Tumorproben. Bei der zweiten untersuchten Ovarialkarzinombiopsie ist eine leicht erhöhte IL-8-Expression durch die Zugabe der Stimuli zu beobachten, wohingegen die IL-8-Expression der Proben, die mit anti-huLT β R mAK 31G4D8 inkubiert wurden, erneut stark variierte. Das größte Gewebestück konnte beim Ovarialkarzinom 3 untersucht werden, welches bereits ohne Stimulierung eine hohe Menge an IL-8 exprimiert. Hier zeigte sich, dass zwischen den unbehandelten Kontrollen und den mit rhuLIGHT stimulierten Proben kein Unterschied zu beobachten war. Durch die Zugabe von agonistischem anti-huLT β R mAK hingegen ist die Expression von IL-8 im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ($p = 0,0049$). Die Menge an IL-8 ist beim Ovarialkarzinomgewebe 4 ähnlich hoch wie bei Tumor 3. Eine Stimulierung führt jedoch nicht zu einer Induktion der IL-8-Expression.

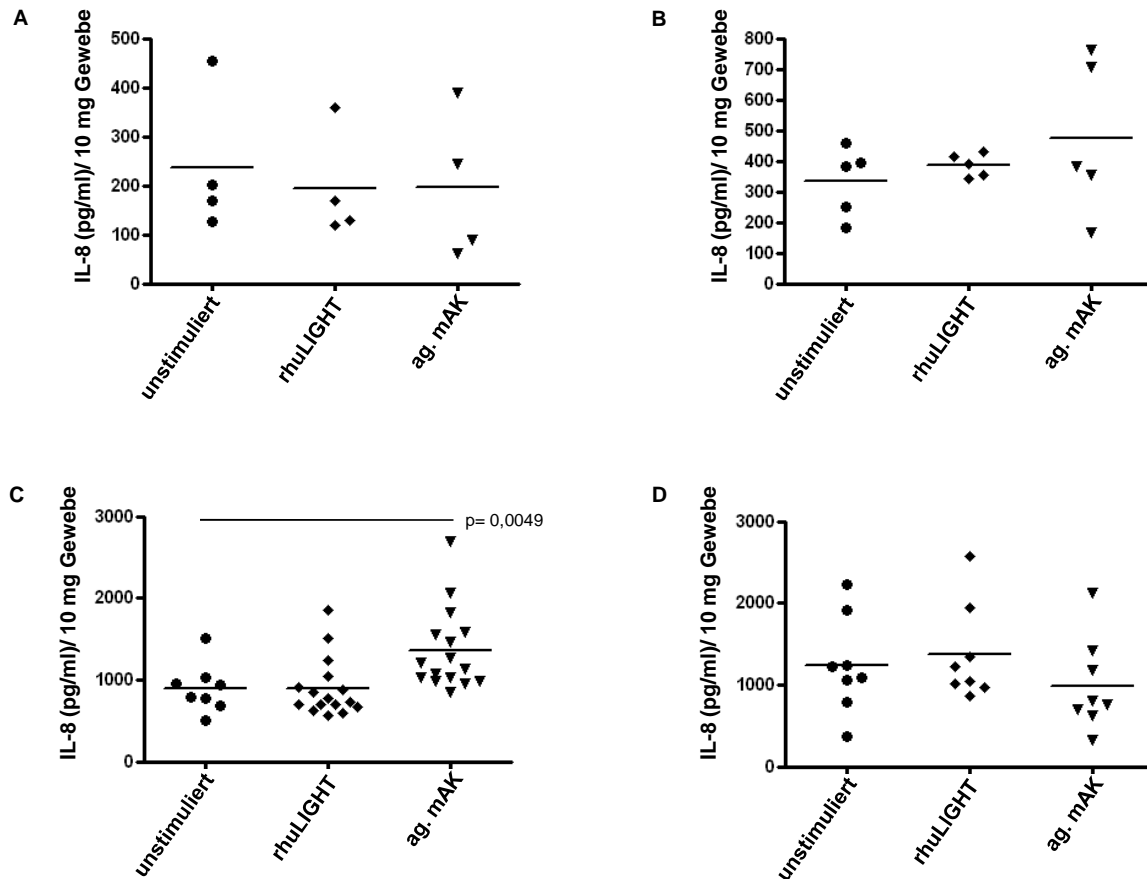


Abb. 43 IL-8-Expression der Ovarialkarzinomgewebe. Die Tumormproben wurden sofort nach Erhalt in kleine Stücke geschnitten, gewogen und für 2 h in Kultur genommen. Die Anzahl der Gewebestücke richtete sich nach der Größe der erhaltenen Tumormproben. Es erfolgte entweder eine Stimulation mit rhuLIGHT ($c= 10 \mu\text{g/ml}$) oder mit agonistischem anti-huLT β R mAK ($c= 5 \mu\text{g/ml}$) oder die Tumore wurden unbehandelt belassen. Aus dem Kulturüberstand wurde die IL-8-Konzentration mittels eines ELISAs bestimmt. Die Werte wurden auf 10 mg Tumorgewebe umgerechnet. **A:** Tumor 1, **B:** Tumor 2, **C:** Tumor 3, **D:** Tumor 4. Bei Tumor 3 ist der Unterschied zwischen den unstimulierten und den mit ag. mAK stimulierten Proben statistisch signifikant ($p= 0,0049$).

Die Anzahl der untersuchten Tumore ist zu gering, um definitive Aussagen über die Erhöhung der IL-8-Expression durch die Stimulierung mit rhuLIGHT oder mit agonistischem anti-huLT β R mAK treffen zu können.

4.2.4 Analyse verschiedener humaner Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von primärem humanen Tumorgewebe und der bei den Experimenten aufgetretenen großen Streuung der Werte wurden verschiedene humane Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien hinsichtlich der Induzierbarkeit der IL-8-Expression analysiert.

4.2.4.1 Nachweis der Expression des $LT\beta R$ und von HVEM

Zunächst wurden die Kolonkarzinomzelllinien Caco-2, SW48, SW480, WiDr, HCT 116 und LoVo und die Ovarialkarzinomzelllinien OAW42, SK-OV-3, OVCAR-3 und Caov-3 auf die Expression des $LT\beta R$ hin untersucht. Dazu wurden die Zellen jeweils mit anti-hu $LT\beta R$ mAK gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (siehe 3.2.14). Dabei zeigte sich, dass alle Zelllinien den $LT\beta R$ auf ihrer Oberfläche exprimieren (siehe Abb. 44).

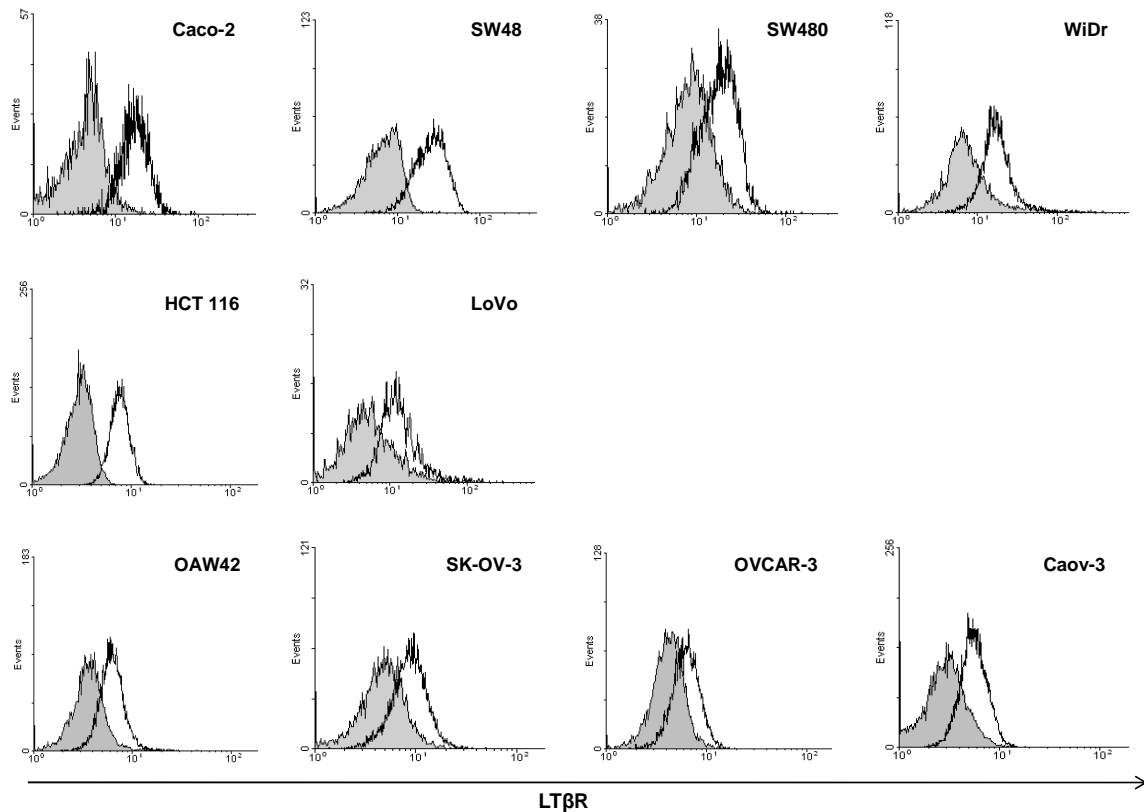


Abb. 44 FACS-Analyse der Expression des $LT\beta R$ auf den verwendeten humanen Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien. Die angegebenen Zelllinien wurden jeweils mit dem anti-hu $LT\beta R$ mAK 31G4D8 gefärbt ($c=1 \mu g$ / Färbung). Als Zweitantikörper diente ein anti-Maus IgG Antikörper (FITC-konjugiert, 1:400). Anschließend erfolgte die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer. grau= Negativkontrolle, ohne Färbung= Färbung des $LT\beta R$.

Neben $LT\beta R$ wird auch HVEM in allen humanen Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien exprimiert (siehe Abb. 45).

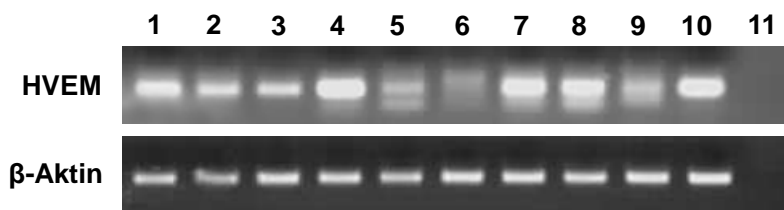


Abb. 45 Nachweis von HVEM in den humanen Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien. Aus den Zellen wurde jeweils RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte der Nachweis von HVEM mittels RT-PCR. Als Negativkontrolle diente β -Aktin. 1: SW480, 2: SK-OV-3, 3: OVCAR-3, 4: LoVo, 5: Caco-2, 6: HCT 116, 7: SW48, 8: WiDr, 9: OAW42, 10: Caov-3, 11: Negativkontrolle ohne cDNA.

4.2.4.2 Stimulierung der humanen Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien

Die oben genannten Zelllinien wurden für die Experimente zunächst in 24-Well-Platten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/Well im Triplikat ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Stimulation mit rhuLIGHT ($c= 10 \mu\text{g/ml}$) für 4 h, 8 h und 24 h und die Analyse der IL-8-Expression mittels ELISA. Parallel dazu wurden die Zellen mit agonistischem anti-huLT β R mAK in einer Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ stimuliert. Die Dauer der Stimulierung ergab sich dabei aus den Ergebnissen, die mit rhuLIGHT erhalten wurden. Abb. 46 zeigt eine Übersicht über die Stimulierungsexperimente.

Stimulus	rhuLIGHT						ag. mAK	
St.-Dauer	4 h		8 h		24 h		siehe Werte	
\pm St. Zelllinie	unst.	st.	unst.	st.	unst.	st.	unst.	st.
Caco-2	8 \pm 1	8 \pm 1	7 \pm 0	8 \pm 0	10 \pm 1	12 \pm 1	-	-
SW48	34 \pm 0	37 \pm 0	33 \pm 1	34 \pm 1	40 \pm 3	42 \pm 1	-	-
SW480	8 \pm 1	9 \pm 1	7 \pm 0	7 \pm 0	7 \pm 0	9 \pm 2	-	-
WiDr	263 \pm 7	277 \pm 10	401 \pm 8	422 \pm 14	746 \pm 9	704 \pm 15	-	-
HCT 116	12 \pm 1	35 \pm 2	16\pm1	43\pm1	21 \pm 3	53 \pm 12	44 \pm 1 (8 h)	48 \pm 2 (8 h)
LoVo	72 \pm 12	154 \pm 41	234\pm13	352\pm4	357 \pm 32	340 \pm 7	88\pm10 (8 h)	395\pm3 (8 h)
OAW42	n.d.	9 \pm 9	12 \pm 9	20 \pm 1	n.d.	16 \pm 3	-	-

SK-OV-3	834±36	741±32	864±6	951±22	1186±15	1402±39	396±16 (24 h)	448±6 (24 h)
OVCAR-3	290±9	342±1	451±3	636±24	1247±20	1141±38	930±82 (8 h)	877±42 (8 h)
Caov-3	137±6	217±4	165±5	344±20	271±1	800±27	283±5 (24 h)	1058±2 (24 h)

Abb. 46 Übersicht über die IL-8-Expression der verschiedenen humanen Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien (siehe 4.2.4.1). Die Zelllinien wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten in Triplikaten ausgesät und nach 24 h mit rhuLIGHT ($c = 10 \mu\text{g/ml}$) oder ag. anti-huLT β R mAK ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Die Kontrollzellen blieben ohne Stimulus. Die jeweilige Stimulationsdauer ist aus der Tabelle zu entnehmen. Mittels eines ELISAs wurde die IL-8-Konzentration im Kulturüberstand bestimmt. Hervorgehoben sind die Zelllinien, bei denen eine Stimulation zu einer Induktion der IL-8-Expression führt. Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Alle Werte sind in pg/ml angegeben. unst.= unstimuliert, st.= stimuliert, St.= Stimulierung.

Die Kolonkarzinomzelllinien Caco-2, SW48 und SW480 exprimieren nur sehr geringe Mengen an IL-8, welche sich auch durch die Zugabe von rhuLIGHT für 4 h, 8 h oder 24 h nicht erhöhen. WiDr-Kolonkarzinomzellen haben von sich aus eine größere IL-8-Expression. Diese kann ebenfalls nicht durch die Stimulierung mit rhuLIGHT induziert werden. Aus diesem Grund wurde bei allen vier Kolonkarzinomzelllinien auf eine weitere Stimulierung mit ag. anti-huLT β R mAK (31G4D8) verzichtet. Die Zelllinie HCT 116 zeigt eine geringe endogene IL-8-Expression. Diese konnte durch die Zugabe von rhuLIGHT für 4 h, 8 h (von 16 ± 1 pg/ml auf 43 ± 1 pg/ml) und 24 h leicht erhöht werden. Für die Stimulation der HCT 116-Zellen mit agonistischem anti-huLT β R mAK wurde eine Inkubationsdauer von 8 h gewählt. Hier konnte jedoch keine Induktion der IL-8-Expression beobachtet werden. LoVo-Kolonkarzinomzellen exprimieren bereits ohne externen Stimulus endogen IL-8. Die Expression des Chemokins konnte durch die Inkubation mit rhuLIGHT erhöht werden. Sowohl nach 4 h als auch nach 8 h (von 234 ± 13 pg/ml auf 352 ± 4 pg/ml) liegt die IL-8-Expression der stimulierten Zellen deutlich über der der Kontrollen. Nach 24 h mit rhuLIGHT als Stimulus zeigt sich jedoch kein Unterschied mehr bezüglich der IL-8-Expression zwischen den stimulierten und den unstimulierten LoVo-Zellen. Die Zugabe von anti-huLT β R mAK für 8 h führt wie die Stimulierung mit rhuLIGHT zu einer Erhöhung der IL-8-Expression (von 88 ± 10 pg/ml auf 395 ± 3 pg/ml).

Die Ovarialkarzinomzelllinie OAW42 exprimiert im unstimulierten Zustand wie Caco-2, SW48 und SW480 geringe Mengen an IL-8. Die Expression des Chemokins wird auch durch die Zugabe von rhuLIGHT für 4 h, 8 h und 24 h nicht induziert. Aus diesem Grund wurde auf

eine Stimulierung mit agonistischem anti-huLT β R mAK verzichtet. Bei der Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 konnte beobachtet werden, dass die bereits vorhandene endogene Expression von IL-8 durch die Zugabe von rhuLIGHT nach 4 h nicht erhöht ist. Nach 8 h bzw. 24 h (von 1186 ± 15 pg/ml auf 1402 ± 39 pg/ml) zeigte sich jedoch eine Steigerung der IL-8-Konzentration im Kulturüberstand im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen. Bei der Stimulation der SK-OV-3 mit agonistischem anti-huLT β R mAK für 8 h ist keine Erhöhung der IL-8-Expression mehr zu sehen. OVCAR-3-Ovarialkarzinomzellen exprimieren wie die SK-OV-3-Zellen von sich aus relativ große Mengen an IL-8. Diese sind durch die Stimulation mit rhuLIGHT für 4 h bzw. 8 h (von 451 ± 3 pg/ml auf 626 ± 24 pg/ml) erhöht. Nach 24 h ist hingegen kein Unterschied mehr zwischen der Kontrolle und den stimulierten Zellen zu erkennen. Da bei der Zugabe von rhuLIGHT eine erhöhte IL-8-Expression nach 8 h zu sehen war, wurden die Zellen auch mit agonistischem anti-huLT β R mAK behandelt. Hierbei zeigte sich jedoch keine Steigerung der IL-8-Konzentration im Kulturüberstand. Bei der Ovarialkarzinomzelllinie Caov-3 ist wie bei den SK-OV-3 und den OVCAR-3 eine endogene IL-8-Expression zu beobachten. Durch die Zugabe von rhuLIGHT war diese nach 4 h oder 8 h leicht erhöht. Bei einer Stimulationsdauer von 24 h zeigte sich eine starke Steigerung der Konzentration des Chemokins im Kulturüberstand (von 271 ± 1 pg/ml auf 800 ± 27 pg/ml). Bei der Stimulation der Zellen mit agonistischem mAK 31G4D8 für 24 h ist ebenfalls eine deutliche Erhöhung der IL-8-Expression zu beobachten (von 283 ± 5 pg/ml auf 1058 ± 2 pg/ml).

4.2.4.3 Transfektion humaner Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien mit pcDNA3.1-I κ B α SR und pcDNA3.1-NIK DN

Um analog zu den Versuchen im Maussystem auch bei den humanen Tumorzelllinien zu untersuchen, welcher der beiden NF κ B-Signalwege bei der Stimulation des LT β R aktiviert wird und zur Expression von IL-8 führt, wurden die mit rhuLIGHT oder agonistischem mAK stimulierbaren Zelllinien mit pcDNA3.1-I κ B α SR zur Hemmung des klassischen und pcDNA3.1-NIK DN zur Blockade des alternativen NF κ B-Signalwegs transfiziert (siehe 3.2.11). Anschließend wurden die Zellen stimuliert. Die Stimulationsbedingungen richteten sich nach den unter 4.2.4.2 erhaltenen Ergebnissen.

Für die Versuche wurde die Kolonkarzinomzelllinie LoVo und die drei Ovarialkarzinomzelllinien SK-OV-3, OVCAR-3 und Caov-3 verwendet.

4.2.4.3.1 LoVo-I κ B α SR und LoVo-NIK DN

Die transfizierten Zellen LoVo-I κ B α SR und LoVo-NIK DN zeigen im unstimulierten Zustand im Vergleich zum Wildtyp eine stark verminderte Expression von IL-8 (siehe Abb. 47). Diese kann durch die Zugabe von rhuLIGHT gesteigert werden. Die Stimulierung der transfizierten Zellen mit agonistischem Antikörper führt jedoch nicht zu einer erhöhten Expression von IL-8. Insgesamt bleibt die IL-8-Expression in den LoVo-I κ B α SR und LoVo-NIK DN mit oder ohne Stimulus unter den Werten der unstimulierten Wildtypzellen.

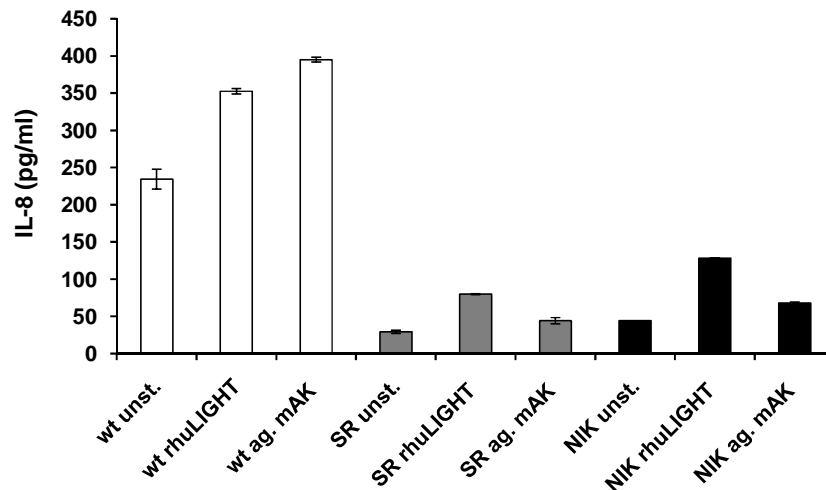


Abb. 47 IL-8-Expression von LoVo wt, LoVo-I κ B α SR und LoVo-NIK DN. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten in Triplikaten ausgesät und nach einem Tag für 8 h mit rhuLIGHT ($c = 10 \mu\text{g/ml}$) oder anti-huLT β R mAK 31G4D8 ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde die IL-8-Konzentration im Überstand mit Hilfe eines ELISAs gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. SR= I κ B α SR, NIK= NIK DN, unst.= unstimuliert.

4.2.4.3.2 SK-OV-3-I κ B α SR und SK-OV-3-NIK DN

Die Zellen SK-OV-3-I κ B α SR haben eine stark verminderte, die SK-OV-3-NIK DN eine leicht verringerte IL-8-Expression im unstimulierten Zustand im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 48). Durch die Inkubation der Zellen mit rhuLIGHT für 24 h wird die Konzentration an IL-8 im Kulturmedium bei den SK-OV-3, die mit pcDNA3.1-NIK DN transfiziert wurden, erhöht. Bei den SK-OV-3-I κ B α SR zeigen sich nur minimale Unterschiede zwischen den stimulierten Zellen und der Kontrolle. Zusammenfassend bleibt aber die IL-8-Expression unterhalb der Werte der unstimulierten Wildtypzellen.

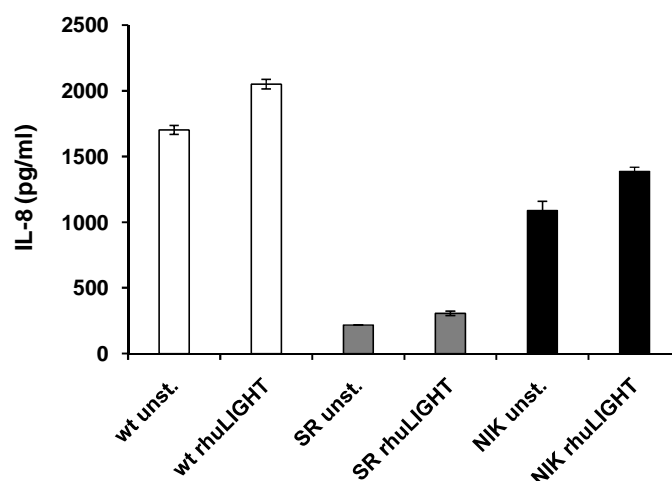


Abb. 48 IL-8-Expression der SK-OV-3 wt, SK-OV-3-I κ B α SR und SK-OV-3-NIK DN. Die Zellen wurden in 24-Well-Platten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in Triplikaten ausgesät und nach einem Tag für 24 h mit rhuLIGHT ($c = 10 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die Bestimmung der IL-8-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines ELISAs. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. SR= I κ B α SR, NIK= NIK DN, unst.= unstimuliert. Daten sind repräsentativ für zwei Experimente.

4.2.4.3.3 OVCAR-3-I κ B α SR und OVCAR-3-NIK DN

Auch die OVCAR-3-I κ B α SR und die OVCAR-3-NIK DN zeigen eine verminderte IL-8-Expression mit oder ohne Stimulus im Vergleich zu den unbehandelten Wildtypzellen (siehe Abb. 49). Im Gegensatz zu den SK-OV-3 lassen sich hier aber die OVCAR-3-I κ B α SR mit rhuLIGHT stimulieren. Bei den OVCAR-3-NIK DN zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und den mit rhuLIGHT inkubierten Zellen.

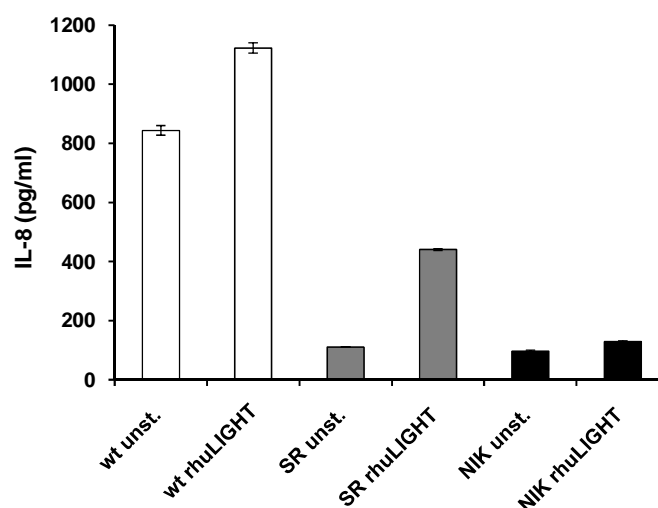


Abb. 49 IL-8-Expression der OVCAR-3 wt, OVCAR-3-I κ B α SR und OVCAR-3-NIK DN. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten in Triplikaten ausgesät und nach einem Tag im Brutschrank für 8 h mit rhuLIGHT ($c = 10 \mu\text{g/ml}$) stimuliert oder unbehandelt belassen. Danach erfolgte die Bestimmung der IL-8-Konzentration im Überstand mit einem ELISA. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. SR= I κ B α SR, NIK= NIK DN, unst.= unstimuliert. Daten sind repräsentativ für drei Experimente.

4.2.4.3.4 Caov-3-I κ B α SR und Caov-3-NIK DN

Die transfizierten Caov-3-I κ B α SR und Caov-3-NIK DN haben im unbehandelten Zustand eine leicht verminderte IL-8-Expression als die unstimulierten Wildtypzellen (siehe Abb. 50). Beide genetisch veränderte Zellen sind jedoch sowohl mit rhuLIGHT als auch mit agonistischem Antikörper stimulierbar und zeigen eine erhöhte Abgabe des Chemokins. Die IL-8-Expression bleibt hingegen bei den Caov-3-I κ B α SR und den Caov-3-NIK DN deutlich unterhalb der Werte der stimulierten Wildtypzellen.

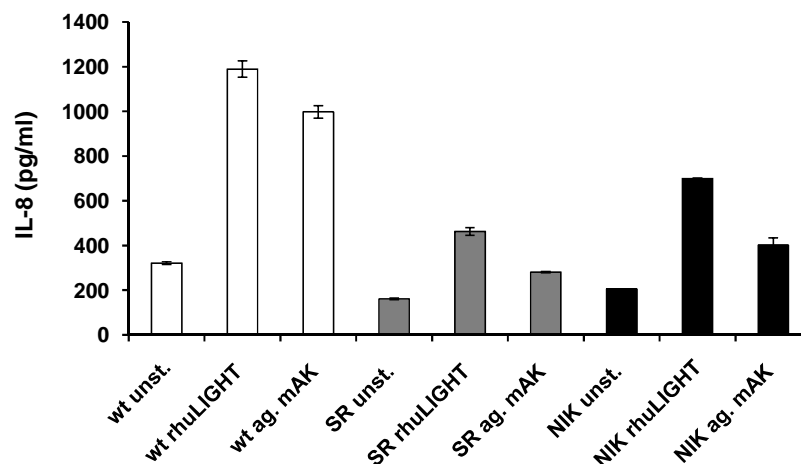


Abb. 50 IL-8-Expression der Caov-3 wt, Caov-3-I κ B α SR und Caov-3-NIK DN. Die Zellen wurden in 24-Well-Platten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in Triplikaten ausgesät und nach einem Tag im Inkubator mit rhuLIGHT ($c = 10 \mu\text{g/ml}$) oder agonistischem mAK ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) für 24 h stimuliert. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die IL-8-Konzentration im Überstand wurde mittels eines ELISAs bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. SR= I κ B α SR, NIK= NIK DN, unst.= unstimuliert. Daten sind repräsentativ für zwei Experimente.

4.2.4.4 MTT-Test der transfizierten Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien

In mehreren Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von rhuLIGHT oder agonistischem anti-huLT β R mAK zu humanen Karzinomzelllinien (HT29, Hep3BT2 oder A375) zu einer Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen führt (Chang et al., 2004; Chen et al., 2003; Hehlhans et al., 2001).

Um zu untersuchen, ob die verwendeten Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien ebenfalls sensitiv auf eine Stimulierung des LT β R reagieren, wurde mit ihnen ein MTT-Test durchgeführt (siehe 3.2.9). Die Stimulierung der LoVo- und der Caov-3-Zellen erfolgte sowohl mit rhuLIGHT ($c = 10 \mu\text{g/ml}$) als auch mit agonistischem anti-huLT β R Antikörper ($c = 5 \mu\text{g/ml}$). Bei den Ovarialkarzinomzellen SK-OV-3 und OVCAR-3 wurde nur rhuLIGHT ($c = 10 \mu\text{g/ml}$) zugegeben. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt.

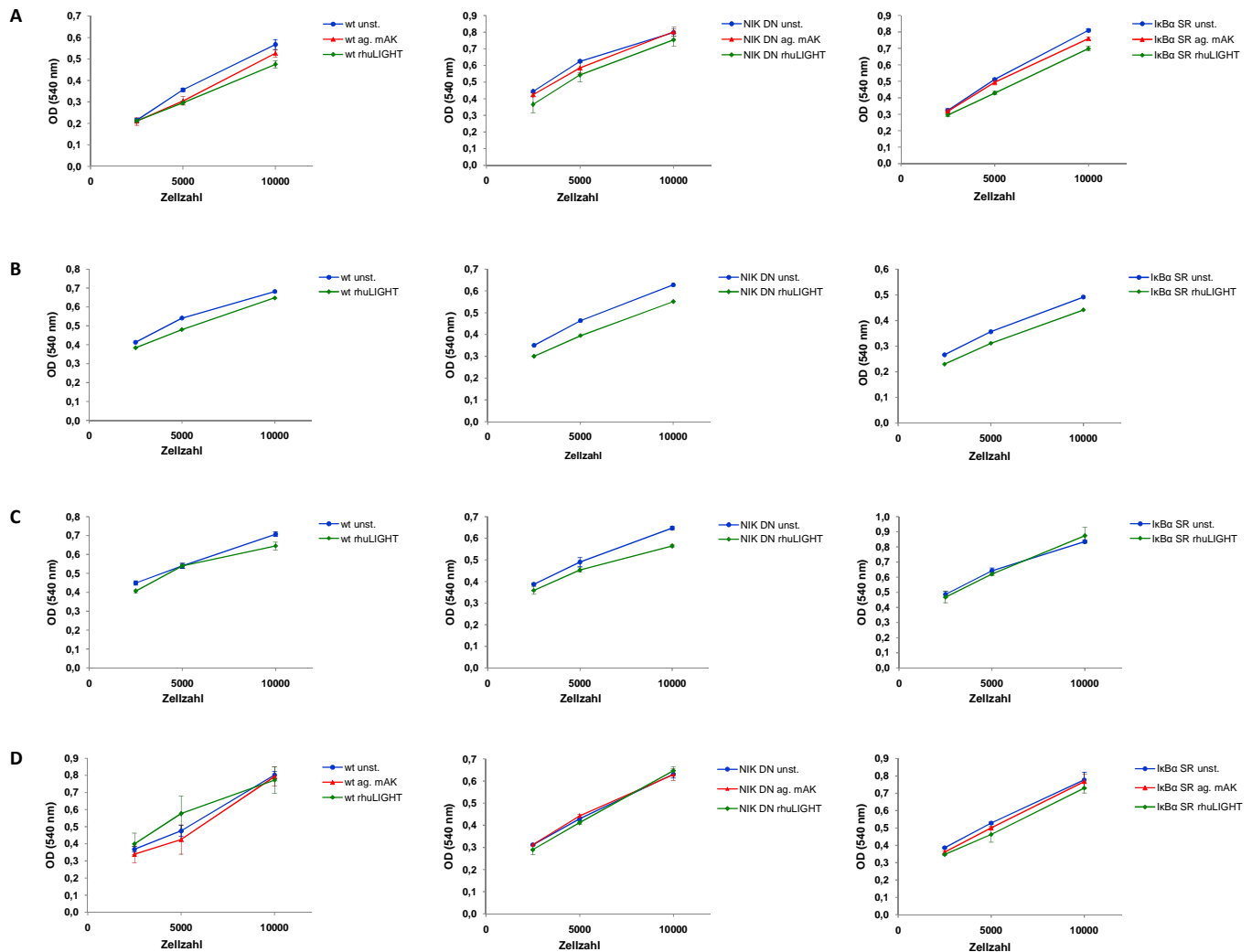


Abb. 51 MTT-Test der Kolonkarzinomzelllinie LoVo und der Ovarialkarzinomzelllinien SK-OV-3, OVCAR-3 und Caov-3. Die Zellen wurden in Triplikaten in 96-Well-Platten in Konzentrationen von 10000, 5000 und 2500 Zellen/Well ausgesät und nach einem Tag im Brutschrank mit rhuLIGHT ($c=10\text{ }\mu\text{g/ml}$) oder ag. anti-huLT β R mAK ($c=5\text{ }\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach 24 h wurde für 4 h MTT und anschließend SDS zugegeben. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. **A:** LoVo, **B:** SK-OV-3, **C:** OVCAR-3, **D:** Caov-3.

Beim MTT-Test zeigten sich unabhängig von der Zugabe von rhuLIGHT oder agonistischem mAK keine oder nur sehr geringe Unterschiede in der Viabilität der Zellen (siehe Abb. 51). Dabei wurden jeweils die Wildtypzellen (links) oder die NIK DN- (Mitte) und IkBa SR (rechts) -Transfektanten miteinander verglichen.

5 Diskussion

5.1 Reduktion der LT β R-Expression auf BFS-1-Fibrosarkomzellen mittels shRNA

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression des LT β R auf BFS-1-Fibrosarkomzellen und seine Aktivierung essentiell für das Fortschreiten des Tumorwachstums auf syngen C57BL/6-Mäusen ist. Dabei wurden bei den Versuchen jedoch nie BFS-1-Zellen verwendet, die defizient für den LT β R sind oder zumindest geringere Mengen an LT β R exprimieren. Der Nachweis, dass die Aktivierung des LT β R auf den Fibrosarkomzellen selbst zum Tumorwachstum beiträgt, erfolgte immer indirekt. Zum einen wurden LT β R-Ig-exprimierende BFS-1-Zellen *in vivo* verwendet, zum anderen wurden die Wildtypfibrosarkomzellen auch in LT $\alpha\beta^{-/-}$ -Mäuse und in LIGHT $^{-/-}$ -Mäuse injiziert (Hehlhans et al., 2002 und nicht veröffentlichte Daten). In allen Fällen war das Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrolle verringert. Nun sollten mit Hilfe der RNA-Interferenz eine Fibrosarkomzelllinie etabliert werden, bei der direkt die Menge an LT β R auf der Oberfläche reduziert ist. Da geplant war, die Auswirkungen der Herunterregulation der LT β R-Expression auch *in vivo* zu untersuchen, wurden die Fibrosarkomzellen stabil mit einem shRNA-exprimierenden Plasmid transfiziert. Der verwendete Vektor (Yang et al., 2007) trägt neben der spezifischen shRNA gegen den LT β R auch ein GFP-Protein, welches an das Gen für das Selektionsantibiotikum gekoppelt ist. Dadurch sollten erfolgreich transfizierte Zellen detektierbar und gegebenenfalls isolierbar sein. Dies ist eine Technik, die oft verwendet wird, wenn ein direkter Nachweis des transfizierten Gens, in diesem Falle der shRNA, schwierig ist. So konnten z.B. in einer Publikation, in der die shRNA über ein lentivirales System in die Zellen eingebracht wurde, die GFP-positiven Zellen mittels Zellsortierung isoliert werden. Dabei wurde nachgewiesen, dass eine stabile Expression des Konstrukts erfolgte, da die Zellen noch nach einer Kultivierung über vier Wochen GFP exprimierten eine deutliche Herunterregulation des Zielgens zeigten (Rubinson et al., 2003). Bei den Versuchen mit den Fibrosarkomzellen war jedoch zu beobachten, dass beinahe 100 % der transfizierten Zellen positiv für GFP waren. Von diesen GFP-positiven Zellen wiesen aber nur 15 % eine Herunterregulation der LT β R-Expression auf. Die Möglichkeit, dass das shRNA-mLT β R-Plasmid für die Zellen toxisch war, konnte ausgeschlossen werden, da sowohl shRNA-mLT β R-Transfektanten als auch die dazugehörigen Kontrollzellen (scramble)

ein normales Wachstumsverhalten im Vergleich zu Wildtypzellen aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wäre es möglich, dass die lange Selektion mit Zeocin sich dahingehend ausgewirkt hat, dass die Zellen die Fähigkeit verlieren, die shRNA zu exprimieren. Dagegen spricht, dass die transfizierten Fibrosarkomzellen auch nach mehreren Wochen in Kultur keine merkliche Verringerung des Knock-downs zeigten. Außerdem wurde in einer Publikation nachgewiesen, dass die Herunterregulation der Genexpression in stabilen Klonen über 2 Monate auf dem gleichen Niveau beibehalten werden kann (Brummelkamp et al., 2002). Ferner besteht die Möglichkeit, dass eine zu hohe Konzentration an Zeocin im Medium dazu geführt hat, dass die Zellen zwar die Fähigkeit, shRNAs zu exprimieren, verloren haben, aber das Resistenzgen und somit das damit fusionierte GFP als Überlebensvorteil im Genom erhalten blieb. Eine andere mögliche Erklärung für die geringe Herunterregulation der LT β R-Expression besteht in der Tatsache, dass das von InvivoGen hergestellte Plasmid eine shRNA-Sequenz enthält, die für diese Anwendung nicht ideal ist. So wäre z.B. ein GC-Gehalt zwischen 30 und 52 % für einen effektiven Knock-down besser (Reynolds et al., 2004), als die 62 % GC der shRNA-mLT β R-Sequenz. Weiterhin sollte eine gut funktionierende shRNA-Sequenz keine Motive mit internen Wiederholungen oder Palindromen aufweisen, da sich dadurch Haarnadelstrukturen bilden könnten, die das Potential der Herunterregulation der Expression eines Gens verringern (Reynolds et al., 2004). Auch hier zeigte eine Analyse mit dem Programm GeneRunner, dass die verwendete shRNA-Sequenz ein solches Motiv beinhaltet. Yang et al. erreichten zwar mit dem shRNA-mLT β R-Plasmid eine signifikante, aber ebenfalls nur geringe Herunterregulation der LT β R-Expression. Bei den Fibrosarkomzellen scheint diese Herunterregulation jedoch nicht zu genügen, um einen deutlichen Unterschied bei der MIP-2-Expression oder der NF κ B-Aktivität zwischen den shRNA-mLT β R-Transfektanten und den Kontrollzellen zu erhalten. Aus diesem Grund wurde auf weiterführende Mausversuche verzichtet, bei denen das Tumorstadium der shRNA-mLT β R- und der shRNA-scramble-Zellen auf syngenen C57BL/6-Mäusen untersucht werden sollte.

5.2 Aktivierung beider NF κ B-Signalwege in den BFS-1-Fibrosarkomzellen und die Auswirkungen auf das Tumorstadium *in vivo*

Bei einer Vielzahl von Tumoren und Tumorzelllinien ist die NF κ B-Aktivität durch onkogene Viren, Veränderungen von Genen, die am NF κ B-Signalweg direkt oder indirekt beteiligt sind, verschiedene andere Stimuli oder aber unbekannte Mechanismen stark erhöht (Chiao et al.,

2002; Lind et al., 2001; Rayet et al., 1999). Dies ist auch bei den BFS-1-Fibrosarkomzellen zu beobachten. Eine Stimulierung des LT β R führt jedoch zu einer zusätzlichen Steigerung der NF κ B-Aktivität in den Zellen (Daten nicht gezeigt). Für die Untersuchung, welcher der beiden NF κ B-Signalwege durch die Zugabe von agonistischem anti-mLT β R mAK induziert wird, wurden die Zellen aufgrund des voraktivierten Phänotyps vor dem Versuch für einen Tag in Medium ohne FCS kultiviert. Für die Dauer der Stimulierung wurden wie in der Literatur üblich ein relativ früher Zeitpunkt (2 h) und zwei spätere Zeitpunkte (6 h und 24 h) gewählt.

Beim klassischen NF κ B-Signalweg wird hauptsächlich das Heterodimer aus p50 und Rel A und beim alternativen das Heterodimer aus p52 und Rel B aktiviert, um anschließend in den Zellkern zu wandern. In einer Studie, bei der murine Embryonalfibroblasten (MEF) aus p50-defizienten Mäusen mit agonistischem anti-mLT β R mAK stimuliert wurden, kommt es jedoch neben der Aktivierung der erwarteten p52-Rel B-Komplexe auch zur Wanderung von p52-Rel A-Heterodimeren in den Zellkern. Umgekehrt sind in MEFs aus p52-defizienten Mäusen nach der Stimulierung des LT β R neben den p50-Rel A-Komplexen auch p50-p50-Dimere und p50-Rel B-Komplexe im Zellkern zu finden. Somit gibt es im LT β R-Signalweg neben den dominierenden p50-Rel A- und p52-Rel B-Heterodimeren auch die in geringerer Anzahl vorkommenden p50-Rel B- und p52-Rel A-Komplexe (Lo et al., 2006). In den Fibrosarkomzellen waren nach Zugabe des agonistischen Antikörpers alle vier NF κ B-Proteine im Zellkern vorhanden, so dass man davon ausgehen kann, dass sowohl der klassische als auch der alternative NF κ B-Signalweg aktiviert wurde. Bereits nach 2 h fanden sich p50 und Rel A in einer hohen Konzentration im Zellkern. Diese nahm nach 6 h und 24 h wieder kontinuierlich ab. Rel B und p52 erreichten ebenfalls nach 2 h die höchste Konzentration im Zellkern. Diese blieb jedoch bei beiden Transkriptionsfaktoren nach 6 h und 24 h relativ konstant. Diese Befunde unterstützen die bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnisse. So wurde in einer Veröffentlichung die NF κ B-Aktivierung bei einer humanen Sarkomzelllinie nach Zugabe eines Chemotherapeutikums untersucht. Ohne eine Unterscheidung zwischen klassischem und alternativem NF κ B-Signalweg vorzunehmen, konnte die höchste Konzentration an NF κ B nach 2 h im Zellkern detektiert werden. Nach 7 h war bereits wieder eine starke Abnahme der Menge des Transkriptionsfaktors zu beobachten (Wang et al., 1999). In einer weiteren Untersuchung wurde der LT β R in MEFs stimuliert. Dies führte wie bei den Fibrosarkomzellen zu einer Aktivierung beider NF κ B-Signalwege. Rel A ist wie bei den BFS-1-Fibrosarkomzellen bereits nach 1-2 h in hoher Konzentration im Zellkern zu finden und

nimmt anschließend wieder kontinuierlich ab. Die Menge an p52 und Rel B steigt ebenfalls nach 2 h an, sammelt sich aber im Gegensatz zu den Fibrosarkomzellen weiter im Zellkern an, so dass die höchste Konzentration nach 24 h erreicht wird (Dejardin et al., 2002). Ähnliche Beobachtungen konnten auch in humanen Endothelzellen und humanen Stromazellen gemacht werden (Bonizzi et al., 2004a; Madge et al., 2008). Somit findet die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs vermutlich im Allgemeinen relativ schnell nach einem Stimulus statt. Der alternative NF κ B-Signalweg scheint eine verzögerte Aktivierungskinetik aufzuweisen.

Für eine genauere Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Stimulierung des LT β R und der Aktivierung beider Signalwege wurden die BFS-1-Fibrosarkomzellen zum einen mit einem Inhibitor des klassischen Signalwegs (IkB α SR) und zum anderen mit einem Inhibitor des alternativen Signalwegs (NIK DN) stabil transfiziert. Beim IkB α SR sind die beiden Serinreste 32 und 36 durch Alanine ausgetauscht, so dass keine Phosphorylierung des Proteins mehr stattfinden kann (Iimuro et al., 1998). Dadurch kann der klassische NF κ B-Signalweg nicht mehr aktiviert werden. Bei der dominant-negativen Form von NIK sind die beiden Aminosäuren Lysin 429 und Lysin 430 jeweils durch ein Alanin ersetzt worden (Holtmann et al., 1999). Somit ist die Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalwegs blockiert. Bei der Stimulierung der mit dem IkB α SR-Plasmid transfizierten BFS-1-Fibrosarkomzellen zeigte sich jedoch, dass nicht nur der klassische, sondern auch der alternative NF κ B-Signalweg beeinträchtigt war. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass die Aktivierung von p52 bei den mit IkB α SR transfizierten Zellen sogar noch unterhalb der Werte der Wildtypkontrolle lag. Ein ähnliches Bild war auch bei den BFS-1-Zellen, die einer Transfektion mit dem NIK DN-Plasmid unterzogen wurden, zu sehen. Hier waren entgegen den Erwartungen ebenfalls sowohl der alternative als auch der klassische Signalweg inhibiert. Der IkB α SR wurde bereits in einer Vielzahl von Studien verwendet. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass durch die Transduktion von Kupffer-Zellen mit einem adenoviralen IkB α SR-Vektor sowohl Rel A als auch p50 nicht mehr in den Zellkern translozieren (Suetsugu et al., 2005). Eine Untersuchung des alternativen NF κ B-Signalwegs fand im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht statt. Im Gegensatz dazu wurden in einer weiteren Veröffentlichung beide Signalwege analysiert. Nach der Transduktion von Dendritischen Zellen mit dem Superrepressor konnten die Zellen nach einer Stimulierung mit LPS nicht mehr zur Reifung gebracht werden. Das bedeutet, dass der klassische Signalweg wie gewünscht gehemmt werden konnte. Gleichzeitig war jedoch eine Aktivierung des

alternativen NF κ B-Signalwegs über einen T-Zellkontakt oder die Stimulierung der Zellen mit agonistischem anti-Maus LT β R mAK noch möglich (Moore et al., 2007). Allerdings ist in einem Experiment, in dem die nukleären Extrakte nach Stimulierung mit LPS im Western Blot untersucht wurden, zu beobachten, dass in den mit I κ B α SR transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen weniger Rel B und p52 vorhanden war. Somit ist wohl der alternative Signalweg durch die Transfektion mit dem I κ B α SR-Plasmid zwar nicht blockiert, eine geringe Beeinträchtigung der Translokation von Rel B und p52 kann jedoch trotzdem auftreten. Dies erklärt aber nicht gänzlich, warum der alternative Signalweg in den mit I κ B α SR transfizierten Fibrosarkomzellen relativ stark gehemmt ist. Gleiches gilt für die BFS-1-Zellen, die das NIK DN-Protein stabil exprimieren. So konnte zwar gezeigt werden, dass die konstitutiv erhöhte NF κ B-Aktivität in verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien durch eine transiente Transfektion entweder mit dem I κ B α SR- oder dem NIK DN-Plasmid in einem NF κ B-Reporterassay verringert werden kann; eine Unterscheidung zwischen alternativem und klassischem Signalweg fand in dieser Studie jedoch ebenfalls nicht statt (Suh et al., 2002). Folglich kann man zwar sagen, dass die NF κ B-Aktivität durch die Transfektion der BFS-1-Fibrosarkomzellen mit beiden Vektoren stark vermindert ist, eine klare Differenzierung der beiden Signalwege ist aber nur sehr eingeschränkt möglich.

Die beiden entweder mit dem I κ B α SR- oder dem NIK DN-Plasmid transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zu den Wildtypfibrosarkomzellen über vier Tage hinweg *in vitro* keine Unterschiede im Wachstumsverhalten. Außerdem war auch zu beobachten, dass die Transfektion mit einem der beiden Konstrukte keinen Einfluss auf die Expression des LT β R auf den BFS-1-Zellen hatte. Daher wurde davon ausgegangen, dass unterschiedliche Eigenschaften der Fibrosarkomzellen in den weiteren Versuchen nur auf die Beeinträchtigung der beiden NF κ B-Signalwege zurückzuführen sind.

Wie bereits erwähnt, ist das BFS-1-Tumorwachstum von einer Aktivierung des LT β R auf den Fibrosarkomzellen und einer daraus resultierenden erhöhten Expression des proangiogenen MIP-2 abhängig (Hehlhans et al., 2002). Diese wird über eine Aktivierung des NF κ B-Signalwegs nach Stimulierung des LT β R gesteuert, da der MIP-2-Promotor eine NF κ B-Bindungsstelle trägt (Widmer et al., 1993). Durch eine Analyse der Bindungsstelle mit Hilfe des Programms GeneRunner (Daten nicht gezeigt) konnte nachgewiesen werden, dass es sich hierbei mehr um eine klassische als um eine alternative NF κ B-Konsensus-Sequenz handelt. Diese Unterscheidung der Konsensus-Sequenzen wurde in einer Studie beschrieben, in der untersucht wurde, welche Gene in Stromazellen nach Stimulierung des LT β R aktiviert

werden. Dabei war zu beobachten, dass die Promotoren von Genen, welche mit der Translokation von p52-Rel B-Heterodimeren in den Zellkern und somit im Zusammenhang mit dem alternativen NFκB-Signalweg beschrieben wurden, eine andere NFκB-Konsensus-Sequenz besitzen als solche, die über den klassischen Weg gesteuert werden (Bonizzi et al., 2004a). Übereinstimmend mit der klassischen Konsensus-Sequenz des MIP-2-Promotors wurde bis dato beschrieben, dass die Aktivierung der Expression des Chemokins mit einer Translokation von Rel A einhergeht (Kim et al., 2003). In einer aktuellen Studie konnte jedoch auch gezeigt werden, dass sich Rel B nach Stimulierung von Makrophagen an den Promotor des MIP-2-Gens anlagert, somit also eine Beteiligung des alternativen NFκB-Signalwegs ebenfalls möglich ist (Yang et al., 2008). Vor diesem Hintergrund wurde nun auch die MIP-2-Expression der Wildtypfibrosarkomzellen mit der der BFS-1-Zellen, die mit dem IκBα SR- oder dem NIK DN-Plasmid transfiziert wurden, verglichen. Bei beiden Transfektanten lag die MIP-2-Expression im unstimulierten Zustand bereits deutlich unterhalb der unstimulierten Wildtypkontrolle. Eine Stimulierung des LTβR mit agonistischem Antikörper führte zu keiner Erhöhung der Konzentration an MIP-2 im Zellkulturüberstand. Daher ist in den BFS-1-Fibrosarkomzellen die Aktivierung des proangiogenen MIP-2 nach Stimulierung des LTβR *in vitro* über beide NFκB-Signalwege möglich.

Um die Auswirkungen der Expression des IκBα Superrepressors oder der dominant-negativen Form von NIK *in vivo* sichtbar zu machen, wurden die Zellen in einem BFS-1-Tumormodell eingesetzt und bezüglich ihres Wachstumsverhaltens mit den Wildtypzellen verglichen. Hierbei wuchsen Tumore, die aus den beiden transfizierten Zelllinien hervorgingen, deutlich langsamer als die entsprechenden Wildtypkontrollen. Das Wachstum der IκBα SR-Fibrosarkome war noch geringer als das der NIK DN-Fibrosarkome und zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zur Wildtypzelllinie. Der Einfluss der Hemmung des klassischen NFκB-Signalwegs auf das Tumorstadium konnte auch in einer Studie beobachtet werden, bei der eine humane Kolonkarzinomzelllinie adenoviral mit einem IκBα SR-Vektor transduziert wurde. Hierbei zeigten die Tumore, die aus den veränderten Kolonkarzinomzellen hervorgegangen waren, ein sehr verzögertes Wachstum (Cusack, Jr. et al., 2000).

Der Zusammenhang zwischen der Aktivierung der beiden NFκB-Signalwege in den BFS-1-Zellen und der Expression von MIP-2 spiegelte sich auch deutlich in der MIP-2-Expression der Tumore *ex vivo* wider. Sowohl die IκBα SR- als auch die NIK DN-Tumore exprimierten viel weniger MIP-2 als die Wildtypumore. Beim Wachstum eines Tumors müssen jedoch ab

einer gewissen Größe neue Blutgefäße gebildet werden, weil die Versorgung über Diffusion nicht mehr ausreichend ist. Da die Tumore aus den transfizierten Fibrosarkomzellen langsamer bzw. überhaupt nicht mehr wachsen, ist wahrscheinlich die Angiogenese, also die Bildung von Blutgefäßen, durch die Expression des proangiogenen MIP-2 gehemmt (Hehlhans et al., 2002).

5.3 Herstellung monoklonaler anti-huLT β R Antikörper

Vor dem Hintergrund, dass durch die Aktivierung des LT β R in den Fibrosarkomzellen vermehrt proangiogenes MIP-2 exprimiert wird, sollten diese Beobachtungen auch in humanen Tumorzelllinien und primärem Tumormaterial überprüft werden. Dazu wurden monoklonale Antikörper gegen den humanen LT β R generiert, mit denen analog zum Maussystem verschiedene Stimulationsexperimente durchgeführt werden sollten.

Für die Immunisierung wurde zunächst rekombinantes huLT β R-Protein hergestellt. Dafür wurde als bakterielles Expressionssystem der *E.coli*-Stamm M15 gewählt. Die Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien bringt sowohl Vor- als auch Nachteil mit sich (Midgett et al., 2007). Auf der einen Seite kann man innerhalb kürzester Zeit große Mengen an rekombinantem Protein herstellen. Außerdem sind die Kulturbedingungen der Bakterien sehr einfach. So entfallen z.B. Transfektionen und die aufwendige Zellkulturarbeit. Auf der anderen Seite finden in den Bakterien keine Glykosylierungen oder andere posttranslationale Modifikationen der exprimierten Proteine statt, so dass die richtige Faltung des rekombinanten LT β R beeinträchtigt sein könnte. Dem sollte durch die Aufreinigung des Proteins unter nativen Bedingungen, d.h. ohne denaturierende Agenzien wie Harnstoff, entgegengewirkt werden.

Da die Extrazellulärdomäne eines Transmembranproteins für die Bindung seiner Liganden verantwortlich ist, wurde nur dieser Bereich des LT β R in den pQE-32-Vektor kloniert. Bei der Expression war auf dem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel eine Bande bei ca. 30 kDa zu sehen, die den Erwartungen entsprach. Gleichzeitig konnte durch den Western Blot auch gezeigt werden, dass die Reinheit des Proteins sehr hoch war. Für die Immunisierung wurde das Antigen den Mäusen zunächst in Kombination mit Titermax verabreicht. Dieses Adjuvans soll dazu führen, dass das Immunsystem über einen längeren Zeitraum stimuliert wird (Depoteffekt) und spezifische Antikörper gegen das gewünschte Antigen hergestellt werden. Bei der Bestimmung des Titers mittels ELISA, bei dem nur Antikörper des Isotyps IgG nachgewiesen wurden, da ein γ -Ketten-spezifischer Zweitantikörper verwendet wurde, zeigte

sich bereits nach der zweiten Immunisierung, dass anti-huLT β R Antikörper im Serum nachweisbar waren. Der Titer verbesserte sich nach der dritten Immunisierung nur geringfügig. Aus diesem Grund wurde die Fusion vier Tage nach einem letzten vierten Boost durchgeführt, bei dem eine größere Dosis an Antigen als bei den vorangegangenen Immunisierungen verwendet wird, um eine starke Immunantwort zu erhalten und die Reifung der B-Zellen zu synchronisieren.

Bei der Fusion wurden die Überstände der Hybridomklone wie schon der Titer der Mäuse mittels eines ELISAs auf die Produktion von spezifischen anti-huLT β R Antikörpern hin getestet. Dabei wurden die ELISA-Platten nicht mit dem zur Immunisierung verwendeten, in *E.coli* exprimierten Protein beschichtet, sondern mit dem in S2-Zellen exprimierten huLT β R-Ig. Dadurch sollte verhindert werden, dass fälschlicherweise Klone als positiv angesehen werden, die Antikörper gegen bakterielle Proteine produzieren, die nach der Aufreinigung noch in der Protein-Fraktion vorhanden waren. Wie bereits erwähnt, wurden die Hybridomüberstände mit einem γ -Ketten-spezifischen Zweitantikörper getestet, um nur Antikörper des Isotyps IgG zu erhalten. Dabei konnten die drei Klone 4D6, 8A8 und 13H6 stabil etabliert werden. Die Bestimmung der Isotypen der drei antikörperproduzierenden Hybridomklone, die zwei Monate nach der Fusion stattfand, brachte ein überraschendes Ergebnis. So wiesen 4D6 und 8A8 beide den Isotyp IgG₁ auf. 13H6 produzierte jedoch entgegen den Ergebnissen bei den anfänglichen ELISAs keine Antikörper des Isotyps IgG, sondern produzierte Antikörper des Isotyps IgM. Da Hybridome aus einer Fusion zwischen einer antikörperproduzierenden B-Zelle und der unsterblichen Mausmyelomzelllinien Sp2/0-Ag14 hervorgehen, sind sie oft sehr instabil und können in der Etablierungsphase (oft mehrere Wochen bis Monate) ihre Fähigkeit, Antikörper zu produzieren, ganz verlieren. Vermutlich war dies beim Klon 13H6 ähnlich, wobei sich hier nur der Isotyp des Antikörpers änderte. Normalerweise zielt man bei einer Fusion bevorzugt auf die Isolierung von IgG-Antikörpern, da IgM-Antikörper einige Nachteile besitzen. So haben diese eine geringere Affinität zum Antigen, da sie die ersten gebildeten Antikörper in einer Immunreaktion sind und somit noch keine weiteren Modifikationen besitzen, die während der Änderung des Isotyps vollzogen werden. Außerdem sind IgM-Antikörper aufgrund der pentameren Struktur schwerer und haben eine viel geringere Halbwertszeit als die IgG-Antikörper (Mix et al., 2006). Die Charakterisierung der Antikörper erfolgte im ELISA, Dot Blot, Western Blot und im Durchflusszytometer (siehe Abb. 36). Sowohl im ELISA als auch im Western Blot war der Klon 13H6 kreuzreaktiv. Ferner wurde im Durchflusszytometer nach der Färbung der Zellen

mit dem Kulturüberstand des Hybridoms 13H6 ein positives Signal detektiert, das jedoch schwächer war als die Positivkontrolle. Um den Klon 13H6 besser bei FACS-Analysen einsetzen zu können, sollte man den Antikörper zunächst über eine geeignete Säule aufreinigen und anschließend biotinylieren. Dadurch würde wahrscheinlich eine Verstärkung des Signals der positiven Zellpopulation erreicht werden.

Aufgrund der Tatsache, dass nur die IgG-Antikörper über die Protein-G-Sepharosesäule aufgereinigt werden konnten, erfolgte die Durchführung der funktionellen Analyse mit 4D6 und 8A8. Als Testsystem wurde dabei die humane Melanomzelllinie A375 verwendet, da bereits bekannt ist, dass sie den LT β R exprimiert und dessen Stimulierung auf den Zellen zu einer Induktion der Expression von Interleukin-8, dem humanen funktionellen Homolog zum MIP-2, führt (Degli-Esposti et al., 1997; Hehlhans et al., 2001). Als Positivkontrolle dienten rhuLIGHT und ein anti-huLT β R mAK (Klon 31G4D8), der agonistisch ist (siehe 4.2.1.10), aber erst Ende des Jahres 2007 im Handel erhältlich war. Keiner der beiden Antikörper 4D6 und 8A8 führten zu einer Erhöhung der IL-8-Expression oder zu einer Aktivierung des NF κ B-Signalweges in den A375-Zellen. Bei der Analyse der antagonistischen Wirkung zeigte sich jedoch, dass 8A8 sowohl die durch rhuLIGHT als auch die durch den anti-huLT β R mAK 31G4D8 induzierte IL-8-Expression verringern konnte. In den Versuchen zur Induktion der NF κ B-Aktivität konnte die antagonistische Eigenschaft des Antikörpers 8A8 ebenfalls beobachtet werden. Durch die Inkubation der Zellen mit 8A8 2 h vor der Zugabe von rhuLIGHT oder dem anti-huLT β R mAK wird die Bindungsstelle für den jeweiligen Liganden blockiert. Allerdings funktioniert diese Hemmung nur teilweise, da die Bindung des antagonistischen Antikörpers reversibel ist. So kann die IL-8-Expression oder die NF κ B-Aktivität nicht bis auf den Wert der unstimulierten Probe reduziert werden. Bei einem zu großen Überschuss von 8A8 (10:1) wird die Blockade vermutlich wieder bis zu einem gewissen Grad aufgehoben, da sich die Antikörpermoleküle gegenseitig an der Bindung hemmen. Um die antagonistische Wirkung von 8A8 noch weiter zu charakterisieren, könnten andere humane Zelllinien für die Versuche verwendet werden (siehe 4.2.4.2).

5.4 Stimulierung von humanem Primärtumorgewebe

Um die Spezifität des beim ELISA positiven anti-huLT β R mAK 3G10H3 bei der Färbung von Paraffinschnitten auszutesten, wurden zunächst humane Milzschnitte verwendet. Hier zeigte sich, dass spezifisch die Zellen der roten Pulpa und nicht die der weißen Pulpa angefärbt waren. Da in der weißen Pulpa größtenteils T- und B-Lymphozyten lokalisiert sind,

die den LT β R nachweislich nicht tragen, und in der roten Pulpa hauptsächlich Zellen vorhanden sind, die den LT β R exprimieren, kann davon ausgegangen werden, dass es möglich ist, mit dem Antikörper 3G10H3 die Expression des LT β R in humanen Geweben nachzuweisen. So zeigte sich bei der Untersuchung von Ovarial- und Kolonkarzinomschnitten, dass der LT β R ebenfalls in diesen Geweben exprimiert wird. Dies konnte durch die Färbung von Brustkarzinomgewebe bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in einer Studie beschrieben, bei der eine größere Anzahl von Brust-, Kolon- und Lungentumoren und verschiedene Melanome auf die Expression des LT β R hin untersucht wurden. Hier waren nach Anfärbung der Paraffinschnitte zwischen 87 % und 96 % der Tumore aus den verschiedenen Gruppen positiv. Die Expression des Rezeptors beschränkte sich dabei hauptsächlich auf die Tumorzellen. Das die Tumorzellen umgebende Stroma zeigte eine geringere Färbung (Lukashev et al., 2006). Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass der LT β R in vielen verschiedenen Tumoren, wie z.B. Kolon- und Ovarialkarzinomen, exprimiert wird.

Eine erhöhte Expression von IL-8 ist sowohl bei Patienten mit Kolonkarzinomen als auch bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen zu beobachten und gleichzeitig ein Hinweis auf den Schweregrad der Erkrankung. Dies konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. So haben Kolonkarzinompatienten einen erhöhten Serumspiegel an IL-8, welcher mit der Schwere der Erkrankung stark zunimmt und als möglicher diagnostischer Marker dienen könnte (Kaminska et al., 2005). Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Ovarialkarzinompatientinnen. Hier konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Konzentration an IL-8 im Serum bei den erkrankten Frauen im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe erhöht ist (Yu et al., 2004). Neben den veränderten Serumkonzentrationen korreliert auch die IL-8-Expression im Tumorgewebe selbst mit dem Schweregrad der Erkrankung. So haben Ovarialkarzinompatientinnen bei einer hohen Expression von IL-8 eine deutlich schlechtere Prognose nach der Behandlung der Tumorerkrankung als diejenigen mit einer geringen IL-8-Expression im Tumorgewebe (Kassim et al., 2004; Merritt et al., 2008). Schließlich konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Ovarialkarzinomzelllinien, die mit einer spezifischen siRNA gegen IL-8 transfiziert wurden, kleinere Tumore auf Nacktmäusen bilden, als die entsprechenden Kontrollen. Diese Beobachtung geht außerdem mit einer geringeren Dichte an Blutgefäßen im Tumor einher, d.h. durch die Behandlung der Zelllinien mit IL-8-siRNA ist die spätere Angiogenese in den Tumoren behindert (Merritt et al., 2008).

Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Aktivierung des LT β R und der Induktion der Expression von proangiogenem IL-8 wurde zunächst frisches, operativ entferntes Tumorgewebe stimuliert. Dieses wurde nach der Operation schnellst möglich auf Eis gelagert, um eine Degradation der RNA oder andere Abbaumechanismen relativ gering zu halten. Nach dem Zerkleinern der Gewebestücke erfolgte sofort die Stimulierung mit agonistischem mAK oder rhuLIGHT *in vitro*. Um sicherzustellen, dass die Rezeptoren, an die die Stimulanzien potenziell binden können, auch im primären Tumorgewebe exprimiert werden, erfolgte die Durchführung einer RT-PCR. Dabei zeigte sich, dass sowohl der LT β R als auch zu einem geringeren Grad HVEM in den Gewebeproben vorhanden war.

Nach der Zugabe des agonistischen mAK oder von rhuLIGHT wurde sowohl die Menge an IL-8-mRNA mittels quantitativer PCR als auch die Expression des Chemokins mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Die RNA, die aus den Tumorproben nach der zweistündigen Stimulierung gewonnen wurde, zeigte in einem Northern Blot keine Degradation, so dass sie bei der qPCR eingesetzt werden konnte. Die Ergebnisse, die mit den beiden Methoden erhalten wurden, waren sowohl bei den Kolon- als auch bei den Ovarialkarzinomen sehr inhomogen. So war die IL-8-Expression in einer Probe durch die Zugabe des agonistischen Antikörpers oder von rhuLIGHT erhöht, in einer anderen Probe des gleichen Tumors war kein Unterschied zu den unstimulierten Geweben nachzuweisen. In einem Fall konnte eine Induktion der IL-8-Expression auf Proteinebene festgestellt werden. Dies war bei einem Ovarialkarzinom (Tumor 3) nach der Stimulierung mit agonistischem mAK zu beobachten. Durch dieses positive Ergebnis kann man davon ausgehen, dass eine Stimulierung von frischem Primärtumormaterial prinzipiell möglich ist. Da jedoch die Zusammensetzung des Gewebes von Tumorart zu Tumorart unterschiedlich ist, müsste eine viel größere Anzahl an Proben untersucht werden. Außerdem wäre es interessant, bei den Tumoren, die durch die Stimulierung des LT β R mit einer erhöhten IL-8-Expression reagieren, Gemeinsamkeiten zu ermitteln. Dies könnte man z.B. mit Hilfe eines DNA-Microarrays erreichen. Hier kommt jedoch wieder die Problematik zum Tragen, dass die Primärtumore sehr große Unterschiede aufweisen. Aufgrund dieser Tatsache wurden für die weiteren Experimente zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Stimulierung des LT β R und der Induktion der IL-8-Expression humane Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien verwendet. Diese haben einen definiertes genetisches Material, besitzen die gleichen Kulturbedingungen und können somit unter konstanten Bedingungen bei den Versuchen eingesetzt werden.

5.5 Stimulierung humaner Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien

Wie schon beim primären Tumormaterial wurde zunächst untersucht, ob der LT β R und HVEM von den verwendeten Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien exprimiert wird. Dabei konnten beide Rezeptoren mittels FACS-Analyse bzw. RT-PCR nachgewiesen werden, so dass eine Stimulierung mit dem agonistischen anti-huLT β R mAK oder mit rhuLIGHT grundsätzlich möglich war. Für die Experimente zum Nachweis der IL-8-Expression auf Proteinebene wurden insgesamt sechs verschiedene Kolonkarzinomzelllinien und vier verschiedene Ovarialkarzinomzelllinien verwendet. Von den sechs Kolonkarzinomzelllinien konnte bei HCT 116 und LoVo nach der Stimulierung mit rhuLIGHT jeweils eine erhöhte IL-8-Expression beobachtet werden. Nur bei der LoVo-Zelllinie war auch eine Induktion der IL-8-Expression nach der Zugabe des agonistischen Antikörpers nachzuweisen. Bei den Ovarialkarzinomzelllinien zeigten von den vier getesteten drei eine Erhöhung der IL-8-Expression nach Stimulierung mit rhuLIGHT (SK-OV-3, OVCAR-3 und Caov-3). Zusätzlich dazu konnte bei der Caov-3-Zelllinie auch die IL-8-Konzentration im Medium durch die Zugabe des agonistischen anti-huLT β R mAK gesteigert werden. Zwischen den Ergebnissen der Stimulierungen und der Menge an exprimiertem HVEM oder LT β R war keine Korrelation zu erkennen.

Bei der Stimulierung der Zellen mit rhuLIGHT stellt sich die grundlegende Frage, welcher der beiden Rezeptoren, der LT β R oder HVEM, für die Induktion der Expression von IL-8 verantwortlich ist. Hierüber finden sich in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. So wurden in einer Studie *human umbilical vein endothelial cells* (= HUVECs), von denen bekannt ist, dass sie beide Rezeptoren exprimieren, mit rekombinantem LIGHT stimuliert. Dies führte zu einer Erhöhung der IL-8-Expression. Durch die Zugabe eines mutierten LIGHT-Proteins, das nur an den LT β R bindet, erhielt man das gleiche Ergebnis wie bei der Stimulierung mit dem rekombinanten LIGHT. Somit konnte man davon ausgehen, dass in diesem Fall nur die Bindung an den LT β R zu einer Erhöhung der IL-8-Expression führte (Chang et al., 2005). Eine weitere Studie, die sich mit der Rekrutierung von NF κ B nach der Stimulierung des LT β R mit LIGHT beschäftigt, zeigt, dass es nach der Bindung von LIGHT an den LT β R zu einer Aktivierung des NF κ B-Signalweges kommt. Dies konnte in LT β R-defizienten Mäusen nicht beobachtet werden. Somit wäre der LT β R nach der Bindung von LIGHT der Hauptrezeptor für die Aktivierung von NF κ B (Kim et al., 2005). Da die IL-8-Expression von der Aktivierung des NF κ B-Signalwegs abhängig ist (Hoffmann et al., 2002), wäre daraus zu schließen, dass LIGHT an den LT β R binden müsste, um eine Induktion der

IL-8-Expression zu erhalten. Schließlich wurde auch beschrieben, dass die Stimulierung einer Prostatakarzinomzelllinie mit LIGHT zu einer verstärkten Proliferation der Zellen und zu einer Aktivierung von NIK, also dem alternativen NFκB-Signalweg, führt (Nadiminty et al., 2007). Hier wurde jedoch keine Unterscheidung getroffen, an welchen der beiden Rezeptoren das LIGHT-Protein gebunden hatte. Da aber bei der Stimulierung von HVEM vermutlich der klassische NFκB-Signalweg aktiviert wird (Heo et al., 2007), ist für die Aktivierung des alternativen Signalwegs eine Stimulierung des LTβR notwendig.

In der Literatur wurde beschrieben, dass Tumorzellen, die mit einem LIGHT-exprimierenden Plasmid transfiziert wurden, in geringerem Umfang als die entsprechenden Kontrollzellen proliferieren. Dabei wurde vermutet, dass LIGHT eine zytotoxische Immunantwort im Tumor induzieren kann (Tamada et al., 2000b). Ebenso wurde beobachtet, dass die Expression von LIGHT im Tumor zu einer massiven Infiltration von T-Lymphozyten führt. Dadurch kommt es zu einer Reduzierung der Größe bereits etablierter, stark fortgeschrittener Tumore aus Ag-104-Zellen (Yu et al., 2004). In beiden Fällen wird die Wirkung von LIGHT dabei wahrscheinlich über die Aktivierung von HVEM auf den T-Lymphozyten vermittelt. Somit sind es die kostimulatorischen Eigenschaften von LIGHT, die zu einer Tumorregression beitragen können. Im Weiteren ist beschrieben, dass die Stimulierung des LTβR zum Auslösen der Apoptose in bestimmten Tumorzelllinien führen kann (Browning et al., 1996; Rooney et al., 2000; VanArsdale et al., 1997). Gleichzeitig kann aber auch der NFκB-Signalweg in verschiedenen Zelllinien aktiviert werden (Dhawan et al., 2008; Mackay et al., 1996). Somit könnte es durchaus sein, dass die Stimulierung des LTβR mit LIGHT oder auch mit dem agonistischen anti-huLTβR Antikörper zu einer Induktion der Expression des proangiogenen IL-8 in den Tumorzellen selbst führt. Betrachtet man jedoch die Gesamtheit eines Tumors *in vivo*, vermittelt LIGHT möglicherweise über die Aktivierung von HVEM auf den T-Lymphozyten die Induktion einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort. Außerdem könnten die Tumorzellen durch die Stimulierung des LTβR zur Apoptose gebracht werden. Je nachdem welcher der Prozesse nun stärker aktiviert wird, kommt es durch die Förderung der Angiogenese zu einem erhöhten Tumorwachstum oder zu einer Tumorregression. Um die molekularen Mechanismen zu verstehen, die dazu führen, dass es durch die Stimulierung mit LIGHT oder agonistischem anti-huLTβR mAK zu einer Induktion der IL-8-Expression kommt, könnte man z.B. einen DNA-Microarray mit den entsprechenden Karzinomzelllinien nach Zugabe der Stimulanzen durchführen.

Zur Analyse der Aktivierung der beiden NF κ B-Signalwege, wurden die Zelllinien, die auf die Stimulierung mit rhuLIGHT oder dem agonistischen anti-huLT β R mAK mit einer erhöhten IL-8-Expression reagierten, mit den Plasmiden zur Hemmung des klassischen (I κ B α SR) oder des alternativen (NIK DN) NF κ B-Signalwegs transfiziert. Nach der Zugabe der Stimulanzien war bei allen Transfektanten eine verringerte IL-8-Expression im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Bei der LoVo- und der Caov-3-Zelllinie ergab sich dabei ein ähnliches Bild. Sowohl die I κ B α SR- als auch die NIK DN-Transfektanten konnten durch die Zugabe von rhuLIGHT im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollen noch zu einer leicht erhöhten IL-8-Expression gebracht werden. Durch die Stimulierung mit dem agonistischen Antikörper konnte jedoch keine Induktion der IL-8-Expression mehr beobachtet werden. Die Konzentration an IL-8 im Medium blieb auf dem Niveau der unstimulierten Kontrolle. Im Vergleich zu den Caov-3-Transfektanten, deren IL-8-Expression durch die Stimulierung mit rhuLIGHT zumindest über den Werten der unstimulierten Wildtypkontrolle lag, war die Konzentration des Chemokins im Kulturüberstand der LoVo-Transfektanten immer unterhalb der Referenzwerte. Die SK-OV-3- und OVCAR-3-Zelllinie, die mit den beiden Plasmiden transfiziert wurden, zeigten ebenfalls sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Zustand eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte IL-8-Expression. Dies konnte auch in einer Studie beobachtet werden, bei der die SK-OV-3-Ovarialkarzinomzelllinie mit einem I κ B α SR-exprimierendem Plasmid transfiziert wurde. Dabei kam es in den hergestellten Transfektanten wie in den vorliegenden Versuchen zu einer Verringerung der IL-8-Expression *in vitro*. Zusätzlich dazu war das Tumorwachstum der SK-OV-3-I κ B α SR-Ovarialkarzinomzellen in Nacktmäusen reduziert (Huang et al., 2000). Obwohl in beiden Ovarialkarzinomzelllinien insgesamt eine verminderte IL-8-Expression durch die Hemmung eines der beiden NF κ B-Signalwege zu sehen war, konnten bei den SK-OV-3-Zellen die NIK DN-Transfektanten noch mit rhuLIGHT stimuliert werden, während bei den OVCAR-3-Zellen die I κ B α SR-Transfektanten nach der Zugabe von rhuLIGHT mit einer Induktion der IL-8-Expression reagierten. Ein Grund für diese Abweichungen in allen hergestellten Transfektanten könnte sein, dass die verminderte IL-8-Expression nicht auf einer geringeren Aktivierung des NF κ B-Signalwegs beruht, sondern dass es in den Zellen durch die Stimulierung mit rhuLIGHT oder dem agonistischen mAK zu einer Erhöhung der Apoptoserate kommt, wie es bereits in verschiedenen Studien beschrieben wurde (Browning et al., 1996; Rooney et al., 2000; VanArsdale et al., 1997). Aus diesem Grund wurde die Viabilität der Zellen und der dazugehörigen Transfektanten in einem MTT-Assay mit und

ohne Stimulierung untersucht. Hierbei konnten keine Unterschiede bei den verschiedenen Zellen beobachtet werden. Dies wird auch durch die Ergebnisse einer Studie unterstützt, bei der gezeigt wurde, dass OVCAR-3-Zellen, die stabil mit dem I κ B α SR transfiziert wurden, im Gegensatz zur Kontrolle keine erhöhte Apoptoserate aufwiesen (Bentires-Alj et al., 1999).

Die abweichende IL-8-Expression könnte aber auch an einer unterschiedlich starken Expression der jeweiligen NF κ B-Inhibitoren liegen. Dabei ergeben sich keine Hinweise, dass einer der beiden NF κ B-Signalwege bei der Induktion der IL-8-Expression stärker involviert wäre. Vielmehr kann man davon ausgehen, dass sowohl bei der Stimulierung mit rhuLIGHT als auch mit dem agonistischen anti-huLT β R mAK beide NF κ B-Signalwege aktiviert werden und bei der Expression von IL-8 involviert sind (Chang et al., 2002; Holtmann et al., 1999).

6 Zusammenfassung

Der Lymphotoxin beta Rezeptor (LT β R), ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, interagiert funktionell sowohl mit dem auf aktivierten B-, T- und NK-Zellen exprimierten Liganden LT $\alpha_1\beta_2$ als auch mit LIGHT. Bisherige Arbeiten haben gezeigt, dass die Stimulierung des LT β R auf Maus-Fibrosarkomzellen (BFS-1) zu einer NF κ B-Aktivierung und zur erhöhten Expression von proangiogenem MIP-2 führt. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Angiogenese und zu einem verstärkten Tumorwachstum *in vivo*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen zwischen der Aktivierung des LT β R, der Induktion von proangiogenem MIP-2 und dem verstärkten Tumorwachstum in einem syngenem Tumormodell der Maus untersucht. Dazu wurde zunächst versucht, die LT β R Expression auf den Maus-Fibrosarkomzellen mittels shRNA herunter zu regulieren. Durch eine stabile Transfektion der Fibrosarkomzellen mit einem spezifischen, gegen den mLT β R gerichteten shRNA-Vektor konnte die LT β R-Expression auf 15 % der Zellen verringert werden. Nach der Stimulierung des LT β R auf den transfizierten Fibrosarkomzellen konnte jedoch keine Verminderung der NF κ B-Aktivierung und der Expression von proangiogenem MIP-2 nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde untersucht, welcher der beiden NF κ B-Signalwege in den Fibrosarkomzellen nach der Stimulierung des LT β R bei der Induktion von proangiogenem MIP-2 aktiviert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass nach LT β R-Stimulierung sowohl der klassische als auch der alternative NF κ B-Signalweg in den Fibrosarkomzellen aktiviert wird. Nach der stabilen Transfektion der Fibrosarkomzellen mit spezifischen NF κ B-Inhibitoren, die den klassischen NF κ B-Weg (IkB α Superrepressor) oder den alternativen NF κ B-Weg (dominant-negative Form von NIK oder NIK DN) hemmen, wurde die MIP-2-Expression in Abhängigkeit der beiden Signalwege untersucht. Die mit den NF κ B-Inhibitoren transfizierten Fibrosarkomzellen exprimieren stark verminderte Mengen an proangiogenem MIP-2, zeigen eine Beeinträchtigung bei der Rekrutierung der NF κ B-Proteine Rel A, Rel B, p50 und p52 und zeichnen sich auf syngenem C57BL/6-Mäusen im Vergleich zu Kontrollzellen durch ein stark verringertes Tumorwachstum aus. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass bereits die Hemmung eines der beiden NF κ B-Signalwege ausreicht, damit das Tumorwachstum *in vivo* vermindert ist.

Die im BFS-1-Tumormodell der Maus erhaltenen Ergebnisse bezüglich der LT β R-Expression und -Aktivierung wurden an humanem Biopsiematerial sowie an entsprechenden humanen Tumorzelllinien überprüft.

Dazu wurden zunächst Antikörper gegen den huLT β R mit Hilfe der Hybridomtechnik hergestellt. Nach der Expression der rekombinanten extrazellulären Domäne des huLT β R in *E.coli* und der Immunisierung von Balb/c-Mäusen konnten drei monoklonale Antikörper produzierende Hybridome (4D6, 8A8 und 13H6) stabil etabliert werden. 4D6 kann im Dot Blot und 8A8 im Western Blot zum Nachweis des LT β R verwendet werden. Außerdem besitzt der Klon 8A8 antagonistische Wirkung. Für die Analyse von Zellen im Durchflusszytometer ist der Hybridomklon 13H6 geeignet. Jedoch zeigte keiner der anti-huLT β R monoklonalen Antikörper eine agonistische Wirkung in Bezug auf die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs oder die Induktion von proangiogenem IL-8.

Die Expression des LT β R in primären humanen Tumorgeweben, wie Kolon- und Ovarialkarzinomen, konnte mit Hilfe eines anti-huLT β R monoklonalen Antikörpers (Klon 3G10H3) nachgewiesen werden. In Stimulierungsexperimenten, die mit primärem postoperativen Kolon- und Ovarialkarzinomgeweben durchgeführt wurden, konnte weder mit Hilfe der quantitativen PCR noch mittels ELISA eindeutig eine Induktion der IL-8 Expression nach LT β R-Stimulierung beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden für weitere Stimulierungsexperimente humane Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien verwendet. Dabei zeigte sich, dass die IL-8-Expression in zwei der sechs untersuchten Kolonkarzinomzelllinien (HCT 116 und LoVo) und in drei der vier getesteten Ovarialkarzinomzelllinien (SK-OV-3, OVCAR-3 und Caov-3) durch die Stimulierung mit rhuLIGHT induzierbar ist. In jeweils einer Kolon- (LoVo) und einer Ovarialkarzinomzelllinie (Caov-3) konnte durch Stimulierung mit agonistischem anti-huLT β R Antikörper eine IL-8-Expression induziert werden. Durch die Hemmung des klassischen (IkB α Superrepressor) oder des alternativen (NIK DN) NF κ B-Signalwegs konnte zudem eine Verringerung der IL-8-Expression nachgewiesen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass es nach der Stimulierung des LT β R zu einer Aktivierung beider NF κ B-Signalwege kommt, die für eine induzierte IL-8-Expression in den untersuchten humanen Kolon- und Ovarialkarzinomzelllinien verantwortlich sind.

7 Literaturverzeichnis

Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E., and Hass, P. E. (1985). Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* **318**, 665-667.

Alimzhanov, M. B., Kuprash, D. V., Kosco-Vilbois, M. H., Luz, A., Turetskaya, R. L., Tarakhovsky, A., Rajewsky, K., Nedospasov, S. A., and Pfeffer, K. (1997). Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 9302-9307.

Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Forster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L., Lipp, M., and Cyster, J. G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* **406**, 309-314.

Baggiolini, M. and Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* **307**, 97-101.

Banks, T. A., Rouse, B. T., Kerley, M. K., Blair, P. J., Godfrey, V. L., Kuklin, N. A., Bouley, D. M., Thomas, J., Kanangat, S., and Mucenski, M. L. (1995). Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J.Immunol.* **155**, 1685-1693.

Basseres, D. S. and Baldwin, A. S. (2006). Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* **25**, 6817-6830.

Benedict, C. A., Banks, T. A., Senderowicz, L., Ko, M., Britt, W. J., Angulo, A., Ghazal, P., and Ware, C. F. (2001). Lymphotoxins and cytomegalovirus cooperatively induce interferon-beta, establishing host-virus detente. *Immunity.* **15**, 617-626.

Bentires-Alj, M., Hellin, A. C., Ameyar, M., Chouaib, S., Merville, M. P., and Bours, V. (1999). Stable inhibition of nuclear factor kappaB in cancer cells does not increase sensitivity to cytotoxic drugs. *Cancer Res.* **59**, 811-815.

Bergers, G. and Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat.Rev.Cancer* **3**, 401-410.

Bodmer, J. L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem.Sci.* **27**, 19-26.

Bonizzi, G., Bebie, M., Otero, D. C., Johnson-Vroom, K. E., Cao, Y., Vu, D., Jegga, A. G., Aronow, B. J., Ghosh, G., Rickert, R. C., and Karin, M. (2004a). Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J.* **23**, 4202-4210.

Bonizzi, G. and Karin, M. (2004b). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**, 280-288.

- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1995). Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* **267**, 1485-1488.
- Browning, J. L. (2008). Inhibition of the lymphotoxin pathway as a therapy for autoimmune disease. *Immunol.Rev.* **223**, 202-220.
- Browning, J. L., Allaire, N., Ngam-ek, A., Notidis, E., Hunt, J., Perrin, S., and Fava, R. A. (2005). Lymphotoxin-beta receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function. *Immunity*. **23**, 539-550.
- Browning, J. L., Dougas, I., Ngam-ek, A., Bourdon, P. R., Ehrenfels, B. N., Miatkowski, K., Zafari, M., Yampaglia, A. M., Lawton, P., Meier, W., and . (1995). Characterization of surface lymphotoxin forms. Use of specific monoclonal antibodies and soluble receptors. *J.Immunol.* **154**, 33-46.
- Browning, J. L., Miatkowski, K., Sizing, I., Griffiths, D., Zafari, M., Benjamin, C. D., Meier, W., and Mackay, F. (1996). Signaling through the lymphotoxin beta receptor induces the death of some adenocarcinoma tumor lines. *J.Exp.Med.* **183**, 867-878.
- Browning, J. L., Ngam-ek, A., Lawton, P., DeMarinis, J., Tizard, R., Chow, E. P., Hession, C., O'Brine-Greco, B., Foley, S. F., and Ware, C. F. (1993). Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* **72**, 847-856.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-553.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D. V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443-446.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **72**, 3666-3670.
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* **288**, 2351-2354.
- Chang, Y. H., Chao, Y., Hsieh, S. L., and Lin, W. W. (2004). Mechanism of LIGHT/interferon-gamma-induced cell death in HT-29 cells. *J.Cell Biochem.* **93**, 1188-1202.
- Chang, Y. H., Hsieh, S. L., Chao, Y., Chou, Y. C., and Lin, W. W. (2005). Proinflammatory effects of LIGHT through HVEM and LTbetaR interactions in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J.Biomed.Sci.* **12**, 363-375.
- Chang, Y. H., Hsieh, S. L., Chen, M. C., and Lin, W. W. (2002). Lymphotoxin beta receptor induces interleukin 8 gene expression via NF-kappaB and AP-1 activation. *Exp.Cell Res.* **278**, 166-174.

- Chen, M. C., Hwang, M. J., Chou, Y. C., Chen, W. H., Cheng, G., Nakano, H., Luh, T. Y., Mai, S. C., and Hsieh, S. L. (2003). The role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in lymphotoxin-beta receptor-mediated cell death. *J.Biol.Chem.* **278**, 16073-16081.
- Chen, Z. J., Parent, L., and Maniatis, T. (1996). Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* **84**, 853-862.
- Cheng, G. and Baltimore, D. (1996). TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation. *Genes Dev.* **10**, 963-973.
- Chiao, P. J., Na, R., Niu, J., Scwab, G. M., Dong, Q., and Curley, S. A. (2002). Role of Rel/NF-kappaB transcription factors in apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer* **95**, 1696-1705.
- Crowe, P. D., VanArsdale, T. L., Walter, B. N., Ware, C. F., Hession, C., Ehrenfels, B., Browning, J. L., Din, W. S., Goodwin, R. G., and Smith, C. A. (1994). A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science* **264**, 707-710.
- Cusack, J. C., Jr., Liu, R., and Baldwin, A. S., Jr. (2000). Inducible chemoresistance to 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (CPT-11) in colorectal cancer cells and a xenograft model is overcome by inhibition of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res.* **60**, 2323-2330.
- De Togni, P., Goellner, J., Ruddle, N. H., Streeter, P. R., Fick, A., Mariathasan, S., Smith, S. C., Carlson, R., Shornick, L. P., Strauss-Schoenberger, J., and . (1994). Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* **264**, 703-707.
- Degli-Esposti, M. A., Davis-Smith, T., Din, W. S., Smolak, P. J., Goodwin, R. G., and Smith, C. A. (1997). Activation of the lymphotoxin beta receptor by cross-linking induces chemokine production and growth arrest in A375 melanoma cells. *J.Immunol.* **158**, 1756-1762.
- Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F., and Green, D. R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity.* **17**, 525-535.
- Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., and Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 193-209.
- Dhawan, P., Su, Y., Thu, Y. M., Yu, Y., Baugher, P., Ellis, D. L., Sobolik-Delmaire, T., Kelley, M., Cheung, T. C., Ware, C. F., and Richmond, A. (2008). The lymphotoxin-beta receptor is an upstream activator of NF-kappaB-mediated transcription in melanoma cells. *J.Biol.Chem.* **283**, 15399-15408.
- Driscoll, K. E. (2000). TNFalpha and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol.Lett.* **112-113**, 177-183.
- Driscoll, K. E., Hassenbein, D. G., Howard, B. W., Isfort, R. J., Cody, D., Tindal, M. H., Suchanek, M., and Carter, J. M. (1995). Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. *J.Leukoc.Biol.* **58**, 359-364.

- Dvorak, H. F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J.Clin.Oncol.* **20**, 4368-4380.
- Ehlers, S., Holscher, C., Scheu, S., Tertilt, C., Hehlhans, T., Suwinski, J., Endres, R., and Pfeffer, K. (2003). The lymphotoxin beta receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes*. *J.Immunol.* **170**, 5210-5218.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Ettinger, R., Mebius, R., Browning, J. L., Michie, S. A., van Tuijl, S., Kraal, G., van Ewijk, W., and McDevitt, H. O. (1998). Effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin on peripheral lymphoid tissue development. *Int.Immunol.* **10**, 727-741.
- Ettinger, R., Munson, S. H., Chao, C. C., Vadeboncoeur, M., Toma, J., and McDevitt, H. O. (2001). A critical role for lymphotoxin-beta receptor in the development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.* **193**, 1333-1340.
- Fava, R. A., Notidis, E., Hunt, J., Szanya, V., Ratcliffe, N., Ngam-ek, A., De Fougerolles, A. R., Sprague, A., and Browning, J. L. (2003). A role for the lymphotoxin/LIGHT axis in the pathogenesis of murine collagen-induced arthritis. *J.Immunol.* **171**, 115-126.
- Fernando, N. H. and Hurwitz, H. I. (2004). Targeted therapy of colorectal cancer: clinical experience with bevacizumab. *Oncologist.* **9 Suppl 1**, 11-18.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Force, W. R., Cheung, T. C., and Ware, C. F. (1997). Dominant negative mutants of TRAF3 reveal an important role for the coiled coil domains in cell death signaling by the lymphotoxin-beta receptor. *J.Biol.Chem.* **272**, 30835-30840.
- Force, W. R., Glass, A. A., Benedict, C. A., Cheung, T. C., Lama, J., and Ware, C. F. (2000). Discrete signaling regions in the lymphotoxin-beta receptor for tumor necrosis factor receptor-associated factor binding, subcellular localization, and activation of cell death and NF-kappaB pathways. *J.Biol.Chem.* **275**, 11121-11129.
- Foung, S. K., Sasaki, D. T., Grumet, F. C., and Engleman, E. G. (1982). Production of functional human T-T hybridomas in selection medium lacking aminopterin and thymidine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **79**, 7484-7488.
- Futterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M. H., and Pfeffer, K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity.* **9**, 59-70.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* **16**, 225-260.

- Gommerman, J. L. and Browning, J. L. (2003a). Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 642-655.
- Gommerman, J. L., Giza, K., Perper, S., Sizing, I., Ngam-ek, A., Nickerson-Nutter, C., and Browning, J. L. (2003b). A role for surface lymphotoxin in experimental autoimmune encephalomyelitis independent of LIGHT. *J.Clin.Invest* **112**, 755-767.
- Granger, G. A., Shacks, S. J., Williams, T. W., and Kolb, W. P. (1969). Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature* **221**, 1155-1157.
- Gray, P. W., Aggarwal, B. B., Benton, C. V., Bringman, T. S., Henzel, W. J., Jarrett, J. A., Leung, D. W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L. P., and . (1984). Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* **312**, 721-724.
- Grech, A., Quinn, R., Srinivasan, D., Badoux, X., and Brink, R. (2000). Complete structural characterisation of the mammalian and Drosophila TRAF genes: implications for TRAF evolution and the role of RING finger splice variants. *Mol.Immunol.* **37**, 721-734.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Harrop, J. A., McDonnell, P. C., Brigham-Burke, M., Lyn, S. D., Minton, J., Tan, K. B., Dede, K., Spampanato, J., Silverman, C., Hensley, P., DiPrinzio, R., Emery, J. G., Deen, K., Eichman, C., Chabot-Fletcher, M., Truneh, A., and Young, P. R. (1998a). Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. *J.Biol.Chem.* **273**, 27548-27556.
- Harrop, J. A., Reddy, M., Dede, K., Brigham-Burke, M., Lyn, S., Tan, K. B., Silverman, C., Eichman, C., DiPrinzio, R., Spampanato, J., Porter, T., Holmes, S., Young, P. R., and Truneh, A. (1998b). Antibodies to TR2 (herpesvirus entry mediator), a new member of the TNF receptor superfamily, block T cell proliferation, expression of activation markers, and production of cytokines. *J.Immunol.* **161**, 1786-1794.
- Hashi, H., Yoshida, H., Honda, K., Fraser, S., Kubo, H., Awane, M., Takabayashi, A., Nakano, H., Yamaoka, Y., and Nishikawa, S. (2001). Compartmentalization of Peyer's patch anlagen before lymphocyte entry. *J.Immunol.* **166**, 3702-3709.
- Hehlhans, T. and Mannel, D. N. (2001). Recombinant, soluble LIGHT (HVEM ligand) induces increased IL-8 secretion and growth arrest in A375 melanoma cells. *J.Interferon Cytokine Res.* **21**, 333-338.
- Hehlhans, T., Muller, P., Stopfer, P., and Mannel, D. N. (2003). Activation of the lymphotoxin-beta receptor induces NFkappaB-dependent interleukin-6 and MIP-2 secretion in mouse fibrosarcoma cells. *Eur.Cytokine Netw.* **14**, 103-107.
- Hehlhans, T. and Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* **115**, 1-20.

- Hehlhans, T., Stoelcker, B., Stopfer, P., Muller, P., Cernaianu, G., Guba, M., Steinbauer, M., Nedospasov, S. A., Pfeffer, K., and Mannel, D. N. (2002). Lymphotoxin-beta receptor immune interaction promotes tumor growth by inducing angiogenesis. *Cancer Res.* **62**, 4034-4040.
- Heo, S. K., Yoon, M. A., Lee, S. C., Ju, S. A., Choi, J. H., Suh, P. G., Kwon, B. S., and Kim, B. S. (2007). HVEM signaling in monocytes is mediated by intracellular calcium mobilization. *J.Immunol.* **179**, 6305-6310.
- Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., and Kracht, M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J.Leukoc.Biol.* **72**, 847-855.
- Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P., Eickemeier, S., Hoffmann, E., Wallach, D., Malinin, N. L., Cooper, J. A., Resch, K., and Kracht, M. (1999). Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol.Cell Biol.* **19**, 6742-6753.
- Honda, K., Nakano, H., Yoshida, H., Nishikawa, S., Rennert, P., Ikuta, K., Tamechika, M., Yamaguchi, K., Fukumoto, T., Chiba, T., and Nishikawa, S. I. (2001). Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J.Exp.Med.* **193**, 621-630.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V., and Goeddel, D. V. (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.* **4**, 387-396.
- Huang, S., Mills, L., Mian, B., Tellez, C., McCarty, M., Yang, X. D., Gudas, J. M., and Bar-Eli, M. (2002). Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am.J.Pathol.* **161**, 125-134.
- Huang, S., Robinson, J. B., Deguzman, A., Bucana, C. D., and Fidler, I. J. (2000). Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Res.* **60**, 5334-5339.
- Idriss, H. T. and Naismith, J. H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc.Res.Tech.* **50**, 184-195.
- Iimuro, Y., Nishiura, T., Hellerbrand, C., Behrns, K. E., Schoonhoven, R., Grisham, J. W., and Brenner, D. A. (1998). NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J.Clin.Invest* **101**, 802-811.
- Jungbeck, M., Stopfer, P., Bataille, F., Nedospasov, S. A., Mannel, D. N., and Hehlhans, T. (2008). Blocking lymphotoxin beta receptor signalling exacerbates acute DSS-induced intestinal inflammation--opposite functions for surface lymphotoxin expressed by T and B lymphocytes. *Mol.Immunol.* **45**, 34-41.
- Kaminska, J., Nowacki, M. P., Kowalska, M., Rysinska, A., Chwalinski, M., Fuksiewicz, M., Michalski, W., and Chechlinska, M. (2005). Clinical significance of serum cytokine measurements in untreated colorectal cancer patients: soluble tumor necrosis factor receptor type I--an independent prognostic factor. *Tumour.Biol.* **26**, 186-194.

- Kassim, S. K., El Salahy, E. M., Fayed, S. T., Helal, S. A., Helal, T., Azzam, E., and Khalifa, A. (2004). Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin.Biochem.* **37**, 363-369.
- Keane, M. P., Belperio, J. A., Moore, T. A., Moore, B. B., Arenberg, D. A., Smith, R. E., Burdick, M. D., Kunkel, S. L., and Strieter, R. M. (1999). Neutralization of the CXC chemokine, macrophage inflammatory protein-2, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J.Immunol.* **162**, 5511-5518.
- Kim, D. S., Han, J. H., and Kwon, H. J. (2003). NF-kappaB and c-Jun-dependent regulation of macrophage inflammatory protein-2 gene expression in response to lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells. *Mol.Immunol.* **40**, 633-643.
- Kim, Y. S., Nedospasov, S. A., and Liu, Z. G. (2005). TRAF2 plays a key, nonredundant role in LIGHT-lymphotoxin beta receptor signaling. *Mol.Cell Biol.* **25**, 2130-2137.
- Kollmar, O., Scheuer, C., Menger, M. D., and Schilling, M. K. (2006). Macrophage inflammatory protein-2 promotes angiogenesis, cell migration, and tumor growth in hepatic metastasis. *Ann.Surg.Oncol.* **13**, 263-275.
- Kumaraguru, U., Davis, I. A., Deshpande, S., Tevethia, S. S., and Rouse, B. T. (2001). Lymphotoxin alpha-/- mice develop functionally impaired CD8+ T cell responses and fail to contain virus infection of the central nervous system. *J.Immunol.* **166**, 1066-1074.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309.
- Lind, D. S., Hochwald, S. N., Malaty, J., Rekkas, S., Hebig, P., Mishra, G., Moldawer, L. L., Copeland, E. M., III, and Mackay, S. (2001). Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* **130**, 363-369.
- Lo, J. C., Basak, S., James, E. S., Quiambo, R. S., Kinsella, M. C., Alegre, M. L., Weih, F., Franzoso, G., Hoffmann, A., and Fu, Y. X. (2006). Coordination between NF-kappaB family members p50 and p52 is essential for mediating LTbetaR signals in the development and organization of secondary lymphoid tissues. *Blood* **107**, 1048-1055.
- Lucas, R., Tacchini-Cottier, F., Guler, R., Vesin, D., Jemelin, S., Olleros, M. L., Marchal, G., Browning, J. L., Vassalli, P., and Garcia, I. (1999). A role for lymphotoxin beta receptor in host defense against Mycobacterium bovis BCG infection. *Eur.J.Immunol.* **29**, 4002-4010.
- Lukashev, M., Lepage, D., Wilson, C., Bailly, V., Garber, E., Lukashin, A., Ngam-ek, A., Zeng, W., Allaire, N., Perrin, S., Xu, X., Szeliga, K., Wortham, K., Kelly, R., Bottiglio, C., Ding, J., Griffith, L., Heaney, G., Silverio, E., Yang, W., Jarpe, M., Fawell, S., Reff, M., Carmillo, A., Miatkowski, K., Amatucci, J., Crowell, T., Prentice, H., Meier, W., Violette, S. M., Mackay, F., Yang, D., Hoffman, R., and Browning, J. L. (2006). Targeting the Lymphotoxin-{beta} Receptor with Agonist Antibodies as a Potential Cancer Therapy. *Cancer Res.* **66**, 9617-9624.

- Lund, F. E., Partida-Sanchez, S., Lee, B. O., Kusser, K. L., Hartson, L., Hogan, R. J., Woodland, D. L., and Randall, T. D. (2002). Lymphotoxin- α -deficient mice make delayed, but effective, T and B cell responses to influenza. *J.Immunol.* **169**, 5236-5243.
- Luther, S. A., Bidgol, A., Hargreaves, D. C., Schmidt, A., Xu, Y., Paniyadi, J., Matloubian, M., and Cyster, J. G. (2002). Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J.Immunol.* **169**, 424-433.
- Luther, S. A., Tang, H. L., Hyman, P. L., Farr, A. G., and Cyster, J. G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 12694-12699.
- Mackay, F., Browning, J. L., Lawton, P., Shah, S. A., Comiskey, M., Bhan, A. K., Mizoguchi, E., Terhorst, C., and Simpson, S. J. (1998). Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis. *Gastroenterology* **115**, 1464-1475.
- Mackay, F., Majeau, G. R., Hochman, P. S., and Browning, J. L. (1996). Lymphotoxin beta receptor triggering induces activation of the nuclear factor kappaB transcription factor in some cell types. *J.Biol.Chem.* **271**, 24934-24938.
- Madge, L. A., Kluger, M. S., Orange, J. S., and May, M. J. (2008). Lymphotoxin- α β 2 and LIGHT Induce Classical and Noncanonical NF- κ B-Dependent Proinflammatory Gene Expression in Vascular Endothelial Cells. *J.Immunol.* **180**, 3467-3477.
- Magez, S., Stijlemans, B., Caljon, G., Eugster, H. P., and De Baetselier, P. (2002). Control of experimental Trypanosoma brucei infections occurs independently of lymphotoxin- α induction. *Infect.Immun.* **70**, 1342-1351.
- Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., and Wallach, D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* **385**, 540-544.
- Mannel, D. N., Rosenstreich, D. L., and Mergenhagen, S. E. (1979). Mechanism of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis: requirement for lipopolysaccharide-sensitive lymphoreticular cells. *Infect.Immun.* **24**, 573-576.
- Marsters, S. A., Ayres, T. M., Skubatch, M., Gray, C. L., Rothe, M., and Ashkenazi, A. (1997). Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF- κ B and AP-1. *J.Biol.Chem.* **272**, 14029-14032.
- Mauri, D. N., Ebner, R., Montgomery, R. I., Kochel, K. D., Cheung, T. C., Yu, G. L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., Spear, P. G., and Ware, C. F. (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin α are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity*. **8**, 21-30.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., and Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF- κ B activation. *Science* **278**, 860-866.

- Merritt, W. M., Lin, Y. G., Spannuth, W. A., Fletcher, M. S., Kamat, A. A., Han, L. Y., Landen, C. N., Jennings, N., De Geest, K., Langley, R. R., Villares, G., Sanguino, A., Lutgendorf, S. K., Lopez-Berestein, G., Bar-Eli, M. M., and Sood, A. K. (2008). Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth. *J.Natl.Cancer Inst.* **100**, 359-372.
- Midgett, C. R. and Madden, D. R. (2007). Breaking the bottleneck: eukaryotic membrane protein expression for high-resolution structural studies. *J.Struct.Biol.* **160**, 265-274.
- Mitchell, T. and Sugden, B. (1995). Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J.Virol.* **69**, 2968-2976.
- Mix, E., Goertsches, R., and Zett, U. K. (2006). Immunoglobulins--basic considerations. *J.Neurol.* **253 Suppl 5**, V9-17.
- Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum, B. J., and Spear, P. G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**, 427-436.
- Moore, F., Buonocore, S., Aksoy, E., Ouled-Haddou, N., Goriely, S., Lazarova, E., Paulart, F., Heirman, C., Vaeremans, E., Thielemans, K., Goldman, M., and Flamand, V. (2007). An alternative pathway of NF-kappaB activation results in maturation and T cell priming activity of dendritic cells overexpressing a mutated IkappaBalpha. *J.Immunol.* **178**, 1301-1311.
- Morel, Y., Schiano de Colella, J. M., Harrop, J., Deen, K. C., Holmes, S. D., Wattam, T. A., Khandekar, S. S., Truneh, A., Sweet, R. W., Gastaut, J. A., Olive, D., and Costello, R. T. (2000). Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *J.Immunol.* **165**, 4397-4404.
- Mukaida, N., Okamoto, S., Ishikawa, Y., and Matsushima, K. (1994). Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J.Leukoc.Biol.* **56**, 554-558.
- Muller, G. and Lipp, M. (2003). Concerted action of the chemokine and lymphotoxin system in secondary lymphoid-organ development. *Curr.Opin.Immunol.* **15**, 217-224.
- Murphy, K. M., Nelson, C. A., and Sedy, J. R. (2006). Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat.Rev.Immunol.* **6**, 671-681.
- Murphy, M., Walter, B. N., Pike-Nobile, L., Fanger, N. A., Guyre, P. M., Browning, J. L., Ware, C. F., and Epstein, L. B. (1998). Expression of the lymphotoxin beta receptor on follicular stromal cells in human lymphoid tissues. *Cell Death.Differ.* **5**, 497-505.
- Nadiminty, N., Chun, J. Y., Hu, Y., Dutt, S., Lin, X., and Gao, A. C. (2007). LIGHT, a member of the TNF superfamily, activates Stat3 mediated by NIK pathway. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **359**, 379-384.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365.

- Natoli, G., Costanzo, A., Ianni, A., Templeton, D. J., Woodgett, J. R., Balsano, C., and Levvero, M. (1997). Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. *Science* **275**, 200-203.
- O'Reilly, M. S. (1997). Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS* **79**, 273-294.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., and Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**, 277-285.
- Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B., and Goeddel, D. V. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724-729.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Rayet, B. and Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* **18**, 6938-6947.
- Rennert, P. D., Browning, J. L., Mebius, R., Mackay, F., and Hochman, P. S. (1996). Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. *J.Exp.Med.* **184**, 1999-2006.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat.Biotechnol.* **22**, 326-330.
- Roach, D. R., Briscoe, H., Saunders, B., France, M. P., Riminton, S., and Britton, W. J. (2001). Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J.Exp.Med.* **193**, 239-246.
- Rooney, I. A., Butrovich, K. D., Glass, A. A., Borboroglu, S., Benedict, C. A., Whitbeck, J. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., and Ware, C. F. (2000). The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *J.Biol.Chem.* **275**, 14307-14315.
- Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., and Goeddel, D. V. (1995a). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**, 1243-1252.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., and Goeddel, D. V. (1995b). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* **269**, 1424-1427.
- Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., and Goeddel, D. V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**, 681-692.
- Ruben, S. M., Klement, J. F., Coleman, T. A., Maher, M., Chen, C. H., and Rosen, C. A. (1992). I-Rel: a novel rel-related protein that inhibits NF-kappa B transcriptional activity. *Genes Dev.* **6**, 745-760.

- Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D. L., Ihrig, M. M., McManus, M. T., Gertler, F. B., Scott, M. L., and Van Parijs, L. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat.Genet.* **33**, 401-406.
- Ryseck, R. P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P., and Bravo, R. (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Mol.Cell Biol.* **12**, 674-684.
- Scheu, S., Alferink, J., Potzel, T., Barchet, W., Kalinke, U., and Pfeffer, K. (2002). Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis. *J.Exp.Med.* **195**, 1613-1624.
- Schluter, D., Kwok, L. Y., Lutjen, S., Soltek, S., Hoffmann, S., Korner, H., and Deckert, M. (2003). Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. *J.Immunol.* **170**, 6172-6182.
- Schoenfeld, H. J., Poeschl, B., Frey, J. R., Loetscher, H., Hunziker, W., Lustig, A., and Zulauf, M. (1991). Efficient purification of recombinant human tumor necrosis factor beta from *Escherichia coli* yields biologically active protein with a trimeric structure that binds to both tumor necrosis factor receptors. *J.Biol.Chem.* **266**, 3863-3869.
- Sedy, J. R., Gavrieli, M., Potter, K. G., Hurchla, M. A., Lindsley, R. C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C. F., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat.Immunol.* **6**, 90-98.
- Sen, R. and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705-716.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahm, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., and Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**, 1495-1499.
- Shaikh, R. B., Santee, S., Granger, S. W., Butrovich, K., Cheung, T., Kronenberg, M., Cheroutre, H., and Ware, C. F. (2001). Constitutive expression of LIGHT on T cells leads to lymphocyte activation, inflammation, and tissue destruction. *J.Immunol.* **167**, 6330-6337.
- Shulman, M., Wilde, C. D., and Kohler, G. (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* **276**, 269-270.
- Smith, C. A., Farrah, T., and Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**, 959-962.
- Song, H. Y., Regnier, C. H., Kirschning, C. J., Goeddel, D. V., and Rothe, M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 9792-9796.
- Spahn, T. W., Eugster, H. P., Fontana, A., Domschke, W., and Kucharzik, T. (2005). Role of lymphotoxin in experimental models of infectious diseases: potential benefits and risks of a

therapeutic inhibition of the lymphotoxin-beta receptor pathway. *Infect.Immun.* **73**, 7077-7088.

Spahn, T. W., Maaser, C., Eckmann, L., Heidemann, J., Luger, A., Newberry, R., Domschke, W., Herbst, H., and Kucharzik, T. (2004). The lymphotoxin-beta receptor is critical for control of murine *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Gastroenterology* **127**, 1463-1473.

Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E., and Seed, B. (1995). RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* **81**, 513-523.

Stopfer, P., Mannel, D. N., and Hehlhans, T. (2004a). Lymphotoxin-beta receptor activation by activated T cells induces cytokine release from mouse bone marrow-derived mast cells. *J.Immunol.* **172**, 7459-7465.

Stopfer, P., Obermeier, F., Dunger, N., Falk, W., Farkas, S., Janotta, M., Moller, A., Mannel, D. N., and Hehlhans, T. (2004b). Blocking lymphotoxin-beta receptor activation diminishes inflammation via reduced mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) expression and leucocyte margination in chronic DSS-induced colitis. *Clin.Exp.Immunol.* **136**, 21-29.

Suetsugu, H., Iimuro, Y., Uehara, T., Nishio, T., Harada, N., Yoshida, M., Hatano, E., Son, G., Fujimoto, J., and Yamaoka, Y. (2005). Nuclear factor {kappa}B inactivation in the rat liver ameliorates short term total warm ischaemia/reperfusion injury. *Gut* **54**, 835-842.

Suh, J., Payvandi, F., Edelstein, L. C., Amenta, P. S., Zong, W. X., Gelinas, C., and Rabson, A. B. (2002). Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate* **52**, 183-200.

Sun, S. C. and Xiao, G. (2003). Deregulation of NF-kappaB and its upstream kinases in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **22**, 405-422.

Suresh, M., Lanier, G., Large, M. K., Whitmire, J. K., Altman, J. D., Ruddle, N. H., and Ahmed, R. (2002). Role of lymphotoxin alpha in T-cell responses during an acute viral infection. *J.Virol.* **76**, 3943-3951.

Takeshita, F. and Ochiya, T. (2006). Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci.* **97**, 689-696.

Takeuchi, M., Rothe, M., and Goeddel, D. V. (1996). Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J.Biol.Chem.* **271**, 19935-19942.

Tamada, K., Shimozaeki, K., Chapoval, A. I., Zhai, Y., Su, J., Chen, S. F., Hsieh, S. L., Nagata, S., Ni, J., and Chen, L. (2000a). LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J.Immunol.* **164**, 4105-4110.

Tamada, K., Shimozaeki, K., Chapoval, A. I., Zhu, G., Sica, G., Flies, D., Boone, T., Hsu, H., Fu, Y. X., Nagata, S., Ni, J., and Chen, L. (2000b). Modulation of T-cell-mediated immunity

in tumor and graft-versus-host disease models through the LIGHT co-stimulatory pathway. *Nat.Med.* **6**, 283-289.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 4350-4354.

Umezawa, K. (2006). Inhibition of tumor growth by NF-kappaB inhibitors. *Cancer Sci.* **97**, 990-995.

VanArsdale, T. L., VanArsdale, S. L., Force, W. R., Walter, B. N., Mosialos, G., Kieff, E., Reed, J. C., and Ware, C. F. (1997). Lymphotoxin-beta receptor signaling complex: role of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 recruitment in cell death and activation of nuclear factor kappaB. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 2460-2465.

Varney, M. L., Johansson, S. L., and Singh, R. K. (2006). Distinct expression of CXCL8 and its receptors CXCR1 and CXCR2 and their association with vessel density and aggressiveness in malignant melanoma. *Am.J.Clin.Pathol.* **125**, 209-216.

Volpert, O. V., Stellmach, V., and Bouck, N. (1995). The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression. *Breast Cancer Res.Treat.* **36**, 119-126.

Wajant, H., Gerspach, J., and Pfizenmaier, K. (2005). Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 55-76.

Wajant, H., Grell, M., and Scheurich, P. (1999). TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **10**, 15-26.

Wang, C. Y., Cusack, J. C., Jr., Liu, R., and Baldwin, A. S., Jr. (1999). Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat.Med.* **5**, 412-417.

Wang, J., Foster, A., Chin, R., Yu, P., Sun, Y., Wang, Y., Pfeffer, K., and Fu, Y. X. (2002). The complementation of lymphotoxin deficiency with LIGHT, a newly discovered TNF family member, for the restoration of secondary lymphoid structure and function. *Eur.J.Immunol.* **32**, 1969-1979.

Ware, C. F. (2005). Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu.Rev.Immunol.* **23**, 787-819.

Ware, C. F. (2008). Targeting lymphocyte activation through the lymphotoxin and LIGHT pathways. *Immunol.Rev.* **223**, 186-201.

Widmer, U., Manogue, K. R., Cerami, A., and Sherry, B. (1993). Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines. *J.Immunol.* **150**, 4996-5012.

Wilhelm, P., Riminton, D. S., Ritter, U., Lemckert, F. A., Scheidig, C., Hoek, R., Sedgwick, J. D., and Korner, H. (2002). Membrane lymphotoxin contributes to anti-leishmanial

immunity by controlling structural integrity of lymphoid organs. *Eur.J.Immunol.* **32**, 1993-2003.

Williams-Abbott, L., Walter, B. N., Cheung, T. C., Goh, C. R., Porter, A. G., and Ware, C. F. (1997). The lymphotoxin-alpha (LTalpha) subunit is essential for the assembly, but not for the receptor specificity, of the membrane-anchored LTalpha1beta2 heterotrimeric ligand. *J.Biol.Chem.* **272**, 19451-19456.

Wilson, A. P. (1984). Characterization of a cell line derived from the ascites of a patient with papillary serous cystadenocarcinoma of the ovary. *J.Natl.Cancer Inst.* **72**, 513-521.

Wu, Q., Salomon, B., Chen, M., Wang, Y., Hoffman, L. M., Bluestone, J. A., and Fu, Y. X. (2001). Reversal of spontaneous autoimmune insulinitis in nonobese diabetic mice by soluble lymphotoxin receptor. *J.Exp.Med.* **193**, 1327-1332.

Xiao, G., Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (2001). NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol.Cell* **7**, 401-409.

Xie, K. (2001). Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**, 375-391.

Yang, D., Ud, D. N., Browning, D. D., Abrams, S. I., and Liu, K. (2007). Targeting lymphotoxin beta receptor with tumor-specific T lymphocytes for tumor regression. *Clin.Cancer Res.* **13**, 5202-5210.

Yang, J., Luan, J., Yu, Y., Li, C., DePinho, R. A., Chin, L., and Richmond, A. (2001). Induction of melanoma in murine macrophage inflammatory protein 2 transgenic mice heterozygous for inhibitor of kinase/alternate reading frame. *Cancer Res.* **61**, 8150-8157.

Yang, S. R., Yao, H., Rajendrasozhan, S., Chung, S., Edirisinghe, I., Valvo, S., Fromm, G., McCabe Jr, M. J., Sime, P. J., Phipps, R. P., Li, J. D., Bulger, M., and Rahman, I. (2008). RelB is differentially regulated by I{kappa}B-Kinase{alpha} (IKK{alpha}) in B Cells and Mouse Lung by Cigarette Smoke. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*

Yu, K. Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y., Ebner, R., and Kwon, B. S. (1999). A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J.Biol.Chem.* **274**, 13733-13736.

Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Chin, R. K., Wang, J., Wang, Y., Schietinger, A., Philip, M., Schreiber, H., and Fu, Y. X. (2004). Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. *Nat.Immunol.* **5**, 141-149.

Zlotnik, A. and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* **12**, 121-127.

8 Anhang

Manuskripte in Vorbereitung:

Neutralization of soluble LIGHT ameliorates acute DSS-induced intestinal inflammation

Michaela Jungbeck, Barbara Daller, Josef Federhofer, Anja Wege, Nadin Wimmer, Daniela N. Männel und Thomas Hehlhans

Activation of lymphotoxin- β receptor by T and B cells promotes tumor growth using both canonical and non-canonical NF κ B signalling pathways

Barbara Daller, Werner Müsch, Sergei Nedospasov, Daniela N. Männel und Thomas Hehlhans

Vortrag beim *37. Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGFI)* 2007 in Heidelberg: “Neutralization of LIGHT ameliorates DSS-induced intestinal inflammation”

Poster:

Posterpräsentation beim *37. Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGfI)* 2007 in Heidelberg: “Neutralization of LIGHT ameliorates DSS-induced intestinal inflammation”

Posterpräsentation beim *Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfI)* 2008 in Wien: “Activation of lymphotoxin- β receptor by T and B cells promotes tumor growth using both canonical and non-canonical NF κ B signalling pathways”

Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Hehlhans für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung und Förderung während der letzten drei Jahre. Unsere gemeinsamen Besprechungen waren stets von konstruktiven Diskussionen begleitet.

Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel möchte ich besonders für ihre Diskussionsbereitschaft während der Mittwochsseminare danken.

Herrn Prof. Dr. Ralph Witzgall möchte ich für die konstruktiven Besprechungen und die Bereitschaft zur fakultätsinternen Vertretung dieser Dissertation danken.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank Frau Dr. Anja Wege für die kritische Durchsicht des Manuskripts und ihre Unterstützung.

Ganz besonders herzlich danke ich Johannes, Nadin, Hannes und Louay für die angenehme Atmosphäre im Labor und Büro und für die anregenden und unterhaltsamen Gespräche, die vor allem während des Zusammenschreibens hilfreich waren.

Ein herzliches Dankeschön auch an Veronika Hochleitner für die Hilfe bei Fusion Nr. 4, Sabine Laberer für die Hilfe in RNA-Dingen, Karin Holz für die Unterstützung bei den Mausversuchen und Dorothea Weber-Steffens für die Einweihung in die Geheimnisse der Zellkultur und Hybridomherstellung.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Monika Bäumel für ihr allzeit offenes Ohr bedanken.

Unserer Sekretärin Luise Kroher danke ich für ihre Hilfe bei allen organisatorischen Angelegenheiten.

Ein ganz großer Dank gilt meinem Freund Fabian, der immer ein offenes Ohr für meine Geschichten aus dem Laboralltag hatte.

Zu guter Letzt möchte ich mich in besonderem Maße herzlichst bei meinen Eltern bedanken, ohne deren jahrelange Unterstützung Vieles nicht möglich gewesen wäre.

